

Estrogênio e progesterona modulam a expressão da proteína da Na⁺-K⁺-ATPase e do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas

Jones Bernardes Graceli

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, ES 2008

Jones Bernardes Graceli

Estrogênio e progesterona modulam a expressão da proteína da Na⁺-K⁺-ATPase e do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Margareth Ribeiro Moysés (PPGCF/UFES/ES)

CO-ORIENTADOR

Prof^o Dr^o Marcelo Marcos Morales (IBCCF/UFRJ/RJ)

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, ES 2008

Estrogênio e progesterona modulam a expressão da proteína da Na⁺-K⁺-ATPase e do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas

Jones Bernardes Graceli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 21 de novembro de 2008, por:

Prof^a Dr^a Margareth Ribeiro Moysés –Orientadora, UFES.

Prof Dr Marcelo Marcos Morales –Co-orientador, UFRJ.

Prof^a Dr^a Maria Souza de Oliveira, USP, SP.

Prof^a Dr^a Nazaré Souza Bissoli, UFES

Prof^a Dr^a Gláucia Rodrigues. Abreu, UFES

Coordenador do PPGCF:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, ES 2008

Dedico este trabalho à minha mãe, Iracy, e ao meu pai, Jones, pela confiança, pelo grande incentivo, pelo exemplo de vida, pelo carinho e pelo amor, além das condições ofertadas para que pudesse me dedicar a este objetivo. E, claro aos meus professores Margareth R. Moysés e Marcelo M. Morales.

Muito obrigado mesmo!!!!!!!!!!.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, ES 2008

Agradecimentos

A Deus por estar sempre ao meu lado nos momentos de provas, de angústias e de dúvidas, dando-me força, perseverança e humildade para continuar e, não é que continuei mesmooo!!!!

A todos os meus familiares, em especial: minha mãe, Iracy, meu pai, Jones, minha avó, Brígida (em memória), minhas tias, Ancelma, Irca e Ilma e meus tios, Ozílio e Carlos Eugênio, pela paciência, incentivo e pelo carinho em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Margareth Ribeiro Moysés, por ter me aceito como orientado, demonstrando, assim, confiança em minha pessoa e em meu trabalho. Agradeço tudo que aprendi e estou ainda aprendendo, o que permitiu que me tornasse melhor não só como aluno, mas também como pessoa. Obrigado pela atenção e carinho, que não são apenas de uma professora-pesquisadora, mas de uma verdadeira mãe cientista.

Ao Prof Dr. Marcelo Marcos Morales por ter me aceito como co-orientado em seu laboratório de Fisiologia Celular e Molecular no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ) me dando todas as condições necessárias para a realização deste trabalho. Agradeço tudo que aprendi a orientação, as discussões, os experimentos, a capacidade de fazer ciência séria e ética, através de várias parcerias e, conseqüentemente, uma grande amizade. E, claro, a paciência e o incentivo em todos os momentos no desenrolar dos protocolos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Molecular e Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na UFRJ, com os quais passei momentos de alegria, de aprendizado e de dificuldades, pois tudo fica mais fácil, quando se

trabalha entre amigos verdadeiros: Carolina Lemos Barbosa (Carolzinha!!!, Obrigado por todo apoio, pelas caronas, pelas discussões, pelos protocolos, pela grande amizade, por tudo!!!!), Débora Ornellas, Felipe Mateus Ornellas (Pela paciência, pelos finais de semanas e feriados perdidos, pelas horas extras, pela amizade, etc), Felipe Mancilha Protta, Jackson de Souza Menezes (pelas orientações nos protocolos, pela amizade e apoio nas maiores dúvidas, pela segurança em momentos de decisões difíceis, pela grande amizade!!!), Raquel Castiglione, Tatiana Marom Guitierrez e André.

Aos amigos no Laboratório de Patologia Celular no Instituto de Morfologia (UFRJ) chefiado pela Profa Dra Chistina Maeda Takya, como Viviam Samoto, Leandro Alves, Leonardo Monção, André Barreira, Luis e Silvania. Um obrigado especial para a Profa Dra Chistina Maeda Takya que disponibilizou vosso laboratório para que pudesse desenvolver o protocolo de Imunofluorescência. Obrigado pelo seu amor e por sua dedicação pela ciência e, pelo meu trabalho.

Aos amigos no Laboratório de Bioquímica Renal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) chefiado pela Prof. Dr. Celso Caruso Neves, como Mira Wengert, Janaína, com os quais apreendi a desenvolver uma alegria diferenciada nos momentos de maior dificuldade no desenrolar dos protocolos. Não podia deixar de mencionar o apoio impar de a Dra Mira Wengert no desenrolar do protocolo da mensuração da Atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ renal. Não sei ao certo como expressar minha gratidão, pelo exemplo, pelo apoio, por ser em alguns momentos “uma luz no fim do túnel, pelos protocolos desenvolvidos em vosso laboratório, pelo meu amadurecimento com pesquisador e pela amizade. Obrigado Prof. Dr. Celso Caruso Neves.

E por fim, e claro não menos importante, meus amigos do Laboratório de Estudos em Coração Isolado da UFES, Washington Gonçalves Luis, Helena Lima Gomes, Érica Broetto, Roger Lyrio Santos, Thiago Dal-Cin de Paula, Mariela Piccin, Marina Dapieve, Renata. Obrigado pelo incentivo e pelo apoio nos momentos de provas.

A todos os professores deste Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES que contribuíram de alguma forma em minha formação.

À equipe da secretaria, Sebastião da Fonseca e Cláudia Batista de Deus, pela colaboração e atenção, quando necessário.

Muito obrigado mesmo!

SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas.....	09
Lista de figuras.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais Experimentais.....	38
3.2 Grupos Experimentais.....	39
3.3 Protocolos Experimentais.....	39
3.3.1 Ovariectomia bilateral.....	39
3.3.2 Reposição hormonal	39
3.3.3 Função renal.....	40
3.3.4 Western blotting	41
3.3.5 Medida da Atividade ATPásica.....	43
3.3.6 Densitometria.....	45
3.3.7 Imunofluorescência.....	45
3.3.8 Cultura celular.....	47
3.3.9 Análise Estatística.....	48
4. RESULTADOS.....	49
5. DISCUSSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores médios de concentrações séricas de estrogênio e de progesterona dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado repostado com benzoato de 17 β -estradiol (OVE) e repostado com progesterona (OVP), por 10 dias	50
Tabela 2: Valores médios das frações de excreção (FE) de Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , e Uréia, fluxo urinário, Ritmo de Filtração Glomerular (RFG), ingestão hídrica e peso corporal, dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado repostado com benzoato de 17 β -estradiol (OVE) e repostado com progesterona (OVP), por 10 dias	52

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Modulação da expressão da proteína e atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em rins de ratas sob diferentes condições. 53
- Figura 2:** Expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas sob diferentes condições. 55
- Figura 3:** Efeito de diferentes concentrações de benzoato de 17 β -estradiol na expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em cultura de células IRPT (túbulo proximal de ratos) sob diferentes condições. 58
- Figura 4:** Efeito de diferentes concentrações de benzoato de 17 β -estradiol na modulação da expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em cultura de células IRPT (túbulo proximal de ratos) sob diferentes condições. 59
- Figura 5:** Imunolocalização do canal de sódio CNGA-1 no túbulo distal e proximal do néfron de ratas controle. 61

RESUMO

Estrogênio (E_2) e progesterona (P_4) são os esteróides femininos que envolvidos na regulação da função reprodutiva e dentre outros efeitos, eles podem modular a expressão e atividade de transportadores de Na^+ do néfron e interferir com a regulação do volume do fluido extracelular. O objetivo desse trabalho é avaliar a influência desses dois hormônios, de forma isolada, sobre a expressão da proteína da Na^+ , K^+ -ATPase e do canal de sódio CNGA-1 renais.

Para tanto utilizamos Ratas Wistar (200-250g) divididas em dois grupos: 1) controle-sham (C, n=4), 2) ovariectomizadas (OVX, n=12). Após 10 dias da ovariectomia bilateral, oito delas foram redivididas e receberam o tratamento subcutâneo de 17- β -estradiol ($2.0\mu g\ kg^{-1}$, OVE, n=4) e de progesterona ($1.7mg\ kg^{-1}$, OVP, n=4) diariamente por 10 dias. Amostras de sangue e de urina foram coletadas para avaliação da função renal. Os animais foram sacrificados por eutanásia e tiveram os rins retirados para a análise da expressão da Na^+ , K^+ -ATPase e do canal CNGA-1 por *Western blotting*.

Observamos um aumento significativo na fração de excreção (FE) de Na^+ no OVX ($0,21\pm 0,02$, $P<0.01$), vs C ($0,12\pm 0,01$), esses valores retornaram ao normal após reposição com E_2 ($0,12\pm 0,01$) ou P_4 ($0,11\pm 0,02$). O fluxo urinário (mL/min) e a ingestão hídrica (mL/dia) foram menores no OVX ($0,004\pm 0,002$; $7,7\pm 1,4$, respectivamente) vs C ($0,01\pm 0,001$; $15,6\pm 1,8$, respectivamente). A expressão e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase cortical foram menores em 44% ($P<0.01$), e 50% ($P<0.05$) nos grupos OVX e C, respectivamente. Apenas no OVE aumentou em 30% a expressão da Na^+ , K^+ -ATPase ($P<0.01$). Não encontramos, alterações significativas na expressão ou na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na medula renal. O tratamento de 24h com E_2 em células de túbulo proximal (CTP), apenas ocasionaram um aumento na expressão da proteína

Na^+ , K^+ -ATPase de 32,5%, 30% e 120% nas doses de 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7}M , respectivamente. E esse aumento na expressão da proteína, foi corroborado com um aumento na atividade da Na^+ - K^+ -ATPase, nas mesmas doses de 150%, 140% e 130%, respectivamente

A expressão da proteína do CNGA-1 cortical foi reduzida em 42% ($P < 0.01$) no OVX, vs C, retornando aos valores normais após reposição com E_2 ou P_4 . O tratamento de 24h com E_2 nas doses de 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7}M aumentaram a expressão do CNGA-1 utilizando CTP em 70%, 80%, 80%, 90% e 110%, respectivamente. Também detectamos, por imunofluorescência, sua localização na região basal nos túbulo proximal e distal do néfron.

A modulação da expressão da proteína e da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase ocorrem de forma similar a modulação da expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1, em córtex renal de ratas, sob influência do estrogênio. Isso sugere que há uma relação funcional entre esses dois carreadores, de maneira que o CNGA-1 poderia manter as concentrações de sódio intracelulares adequadas para o funcionamento da Na^+ , K^+ -ATPase.

ABSTRACT

Estrogen (E_2) and progesterone (P_4) are both steroids hormones and they are involved mainly in the control of female reproductive functions. Among other effects, E_2 and P_4 can modulate Na^+ reabsorption along the nephron altering the body hydroelectrolyte balance. The female hormones can modulate corporal Na^+ balance by alterations of ion channel and ion pumps expressions and activities. In this work, we studied the possible involvement of E_2 and P_4 in modulating the expression and function of Na^+ - K^+ -ATPase pump and sodium channel CNG-A1 in the kidney of female Wistar rats subjected to ovariectomy with or without near-physiological 17 β -estradiol benzoate and progesterone treatment for 10 days. The CNGA-1 and Na-K-ATPase protein expression from cortex and medulla renal were analyzed by Western blot.

The decreased renal cortex expression of CNGA-1 and Na^+ - K^+ -ATPase protein observed in OVX group was restored to control levels after treatment with doses of estradiol and progesterone. The Na^+ , K^+ -ATPase activity in renal cortex decreased in 50% in OVX group and the replacement of estradiol or progesterone in OVX animals increased those parameters to control group values. The other hand, there was no significant variation of, CNGA-1 protein expression, Na^+ , K^+ -ATPase protein expression and activity in the medulla renal tissue of animals subjected to the same treatment. The 17 β -estradiol added to cell culture medium significantly increased rat renal culture proximal tubule cell CNG1-A protein expression and Na^+ , K^+ -ATPase protein expression and activity of control levels.

The indirect immunofluorescence microscopy of the female adult rat kidney labeled with anti-sodium channel-CNG1-A antibody revealed that CNG1-A was expressed in the basolateral membrane of proximal and distal connecting

tubules. The reactivity to this antibody was only seen in kidney cortex. No immunofluorescence was detected in kidney medulla.

This results suggest that $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and CNGA-1 would be included in the family of transporters stimulated by estrogen and progesterone in the kidney and it might have an important role in renal function and that $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and CNGA-1 subunit would be function relation in reabsorption of sodium in the proximal tubules.

INTRODUÇÃO

Em indivíduos normais a composição do fluido corporal, seu volume e a sua distribuição entre os diversos compartimentos celulares devem permanecer dentro de faixas estreitas de variações (Jacobson e Rector, 1990). Esse equilíbrio depende do balanço de água e de sais que são ingeridos e excretados diariamente pelo organismo. Os principais órgãos envolvidos na regulação do volume do fluido extracelular são o trato gastrointestinal e os rins por serem os principais responsáveis, respectivamente, pela absorção, secreção/ excreção de sais e de água (Cowley e Roman, 1996). O volume do fluido extracelular compreende o volume de fluidos contidos nos compartimentos intersticiais, linfáticos e vasculares. A regulação do volume contido dentro dos vasos está relacionada com o controle de um dos mais importantes parâmetros hemodinâmicos, a pressão arterial sistêmica que deve ser mantida dentro dos limites normais para a devida irrigação dos vários tecidos. Além do controle do volume intravascular circulante, a pressão arterial também pode ser alterada por variações do tônus vascular, da força de contração cardíaca e da função endotelial (Santos et. al., 2004).

A composição do volume do fluido extracelular é diferente quando comparada a do meio intracelular, ele é constituído predominantemente de sódio (Na^+) 140 mEq/l e cloreto (Cl^-) 100 mEq/l, contendo, diferentemente do meio intracelular, uma concentração baixa de potássio (K^+). O segundo ânion em abundância no FEC é o bicarbonato (HCO_3^-), presente na concentração de cerca de 25 mEq/l (Macknight & Leaf, 1977). Desta forma, o volume do FEC é, praticamente determinado pelo balanço entre a ingestão e a excreção renal de NaCl por serem os íons osmoticamente ativos mais

abundantes nesse meio. Cerca de 20% do peso corpóreo corresponde ao fluido extracelular, sendo que mais de 90% de sua osmolaridade é devida aos sais de sódio, posto que estes sejam íons tipicamente extracelulares, que geralmente está acompanhado por quantidades equimolares de cloreto. (Macknight e cols., 1977).

Diariamente, dos 1200 litros de sangue que chegam até os rins, 180 litros (L) de plasma são filtrados nos glomérulos, sendo eliminado pelos rins apenas um total de 1 a 2 L de urina em virtude da grande reabsorção que ocorre ao longo dos túbulos renais. A maior parte do sódio filtrado nos glomérulos é reabsorvida ao longo dos vários segmentos do néfron, sendo que nos túbulos proximais, alça de Henle e túbulo distal a reabsorção de sódio é proporcional à quantidade filtrada (Dantzler, 2003). Em contrapartida, ao longo do sistema coletor, composto pelas porções cortical, medular externa e medular interna, a reabsorção do íon é finamente regulada por hormônios, sendo esta fundamental para a manutenção da volemia. Alterações dos níveis circulantes e locais de substâncias que aumentam a excreção de sódio, ou seja, natriuréticas (peptídeo natriurético atrial, bradicinina, adenosina) e que diminuem a excreção de sódio, ou seja, anti-natriuréticas (angiotensina, vasopressina, aldosterona, hormônios tireóideos) estão associadas a modificações na atividade e na expressão dos transportadores iônicos renais e a mudanças do volume extracelular, já que, a reabsorção de Na^+ ao longo do néfron é o processo primário responsável pela reabsorção de água e manutenção do volume do fluido extracelular (Repke & cols., 1995; Morales & cols., 1996; Dantzler, 2003).

Alterações na ingestão de sódio ou nos mecanismos de sua excreção, através do epitélio renal podem estar relacionadas com a gênese de distúrbios do volume do fluido extracelular, tais como a hipertensão, que pode levar ao acometimento de vários órgãos e ao desenvolvimento de doenças, como a insuficiência renal, acidentes vasculares cerebrais e infarto do miocárdio. Essas doenças apresentam alta mortalidade e constituem causa de incapacidade física e laboral na população economicamente ativa, com grande impacto social (Heagerty & cols., 1993; Brown & Haydock, 2000).

Uns dos hormônios que merecem destaque na reabsorção de sódio são os mineralocorticóides, que são representados primordialmente pela aldosterona. Este esteróide possui ação importante na dinâmica de transporte de sódio no epitélio renal diminuindo a excreção de sódio principalmente pela urina, mas também pela saliva, pelo suor e pelas fezes (Guyton, 1989). Em condições normais, a massa de sódio eliminada pelo suor e pelas fezes é desprezível, sendo os rins os principais efetores dessa excreção (Dusing e cols., 1976). A liberação da aldosterona secretada pelo córtex adrenal depende de um refinado controle que envolve a liberação da renina pelas células justaglomerulares dos rins. A renina liberada age sobre o substrato protéico, angiotensinogênio produzido no fígado, dando origem a um decapeptídeo, a angiotensina-I, que sob a ação da enzima conversora de angiotensina, localizada em endotélio, principalmente pulmonar, é transformada no octapeptídeo angiotensina-II. A angiotensina II, além de agir no rim promovendo a reabsorção de sódio no segmento do túbulo proximal, promove no córtex adrenal a liberação da aldosterona. A aldosterona tem

como função principal estimular a reabsorção de sódio, principalmente, através dos segmentos distais do néfron (Work e Jamison, 1987), onde promove o aumento da permeabilidade luminal ao sódio através de canais de sódio conhecidos como Canais de Sódio Epiteliais (ENaC) (Garthy e Palmer, 1997) concomitantemente, à secreção de potássio e de hidrogênio. A reabsorção de sódio leva ao aumento da osmolaridade plasmática com conseqüente estímulo à liberação e secreção do hormônio antidiurético pela hipófise posterior, que ao atuar nos túbulos distais convolutos e nos ductos coletores, ocasiona a ativação e a inserção dos canais de água (aquaporina-2), levando a uma maior reabsorção de água por eles, além de estimular o centro da sede, localizado no sistema nervoso central, com conseqüente estímulo para a ingestão (Tanaka et al., 2004).

Por outro lado, o principal hormônio relacionado com a excreção de sódio pelos rins é o peptídeo natriurético atrial. Este peptídeo é produzido pelos miócitos atriais e o estímulo para a sua liberação na corrente sanguínea é o aumento do volume efetivo de sangue que chega aos átrios, ocasionando seu estiramento mecânico (Antunes et al., 2004). A expansão dos átrios em situações, como, por exemplo, no aumento do volume do fluido extracelular, promove a liberação e a produção do fator atrial natriurético pelos miócitos atriais. O peptídeo natriurético atrial circulante pode inibir o efeito estimulador da angiotensina II na reabsorção de sódio no túbulo proximal, inibir a reabsorção de sódio no ducto coletor, causar vasodilatação medular, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo medular ou ainda, levar a uma redução na liberação de renina, de aldosterona e de vasopressina (Antunes et al., 2004). De modo que sua

principal ação é inibir a reabsorção de sódio na porção medular interna e medular externa do ducto coletor e, desta forma, favorecer a diurese, diminuindo o volume do fluido extracelular a valores normais (Aires, 1999).

Dessa maneira, o organismo depende de um grande número de processos regulatórios para manter o equilíbrio do seu meio interno (líquido extracelular), o que inclui o controle da pressão arterial sistêmica, do volume extra e intracelular, da osmolaridade, do pH, das concentrações iônicas, etc. Estas propriedades do meio interno devem ser mantidas dentro de faixas estreitas de variação para permitir a adequada função celular. Estas propriedades, em seu conjunto, são denominadas de homeostase, e seu estudo é um dos principais objetivos das Ciências Fisiológicas.

Apesar de muitos estudos, os papéis funcionais dos vários transportadores iônicos ao longo do néfron, não estão totalmente esclarecidos. Muito menos são conhecidas as suas participações no transporte regulado por hormônios e os mecanismos moleculares envolvidos.

É evidente, no entanto, que muitos desses fatores autócrinos, endócrinos e parácrinos podem modular a absorção e a excreção de NaCl através da ação sobre os transportadores iônicos presentes no epitélio renal (Kunzelmann & Mall, 2002). Os canais iônicos são geralmente seletivos e transportam íons a favor de seu gradiente eletro-químico (Kunzelmann & Mall, 2002). Nesse sentido, vários processos patológicos, principalmente os que alteram a excreção renal de NaCl, conduzem aos desequilíbrios eletrolíticos no organismo (Kunzelmann & Mall, 2002).

Assim, quando se estuda o transporte trans-epitelial renal, duas vias possíveis devem ser mencionadas, isto é, a transcelular, através das duas

membranas celulares tubulares, a membrana luminal ou apical (ML) e a membrana basolateral (MBL) e a via inter- ou paracelular (através das *tight-junctions*) (Aires et al., 1999).

Na reabsorção no túbulo proximal, o transporte de água segue o de soluto, graças ao pequeno gradiente osmótico existente, pois o fluido luminal nessa porção é ligeiramente hipotônico em relação ao plasma peritubular. O túbulo proximal reabsorve aproximadamente 67% de água filtrada, Na^+ , Cl^- , K^+ e outros solutos. O processo de reabsorção de íons tem como força motriz geradora de gradiente, a enzima Na^+/K^+ -ATPase localizada na membrana basolateral (Feraille and Doucet, 2001).

O Na^+ é reabsorvido por mecanismos diferentes na primeira metade e na segunda metade do túbulo proximal. No segmento inicial, o Na^+ é reabsorvido, pela membrana luminal, através do co-transporte eletrogênico com solutos orgânicos, tais como açúcares e aminoácidos, e também pelo contra-transporte Na^+/H^+ eletroneutro. Este último transporta Na^+ para dentro da célula em troca da secreção luminal de H^+ . Também é observado o co-transporte neutro de Na^+ com ânions orgânicos como o lactato na membrana luminal nesse segmento (Aronson, 1996; Knepper & Brooks, 2001; Dantzler, 2003).

Na segunda metade do túbulo proximal, o Na^+ é reabsorvido através tanto da via trans-celular como da para-celular. Este entra na célula tubular renal pela ação paralela do trocador Na^+/H^+ e um ou mais trocadores aniônicos envolvendo a reabsorção de Cl^- localizados na membrana luminal deste segmento. A energia necessária para este processo é originada pelo gradiente eletroquímico gerado pela bomba Na^+/K^+ na membrana basolateral (Feraille and Doucet, 2001), sendo o Na^+ reabsorvido para o interstício, por transporte

ativo, através do funcionamento desta enzima. O Cl^- por sua vez, é reabsorvido para o interstício pela ação de um co-transportador K^+-Cl^- também localizado na membrana basolateral.

O NaCl é reabsorvido também pela via para-celular nesta porção do túbulo proximal favorecida pelo gradiente de concentração de Cl^- gerada pelo aumento da sua concentração na luz tubular produzida pela grande reabsorção de água nesse segmento. Todavia, uma parte deste NaCl é reabsorvido carregado pelo movimento de água entre os espaços intercelulares (*solvent drag*) (Aronson, 1996; Aronson & Giebisch, 1997; Knepper & Brooks, 2001).

O segmento fino descendente da Alça de Henle é altamente permeável a água pela presença de aquaporinas (canais de água). Nesse segmento, o Na^+ é secretado passivamente para a luz tubular, pelo menos em algumas espécies animais. Já o segmento fino ascendente é impermeável a água e a reabsorção de NaCl é preferencialmente passiva.

A porção grossa ascendente da Alça de Henle reabsorve aproximadamente 25% do NaCl e K^+ filtrados, a reabsorção de Na^+ é feita através de transporte ativo secundário, pelo co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, localizado na membrana luminal e inibido pelo diurético de alça furosemida. Neste segmento não ocorre reabsorção de água, pois seu epitélio é altamente impermeável à água. A reabsorção de Na^+ no túbulo distal convoluto é passiva, através do simporte Na^+-Cl^- ou ativa secundária, pelo trocador Na^+/H^+ . Virtualmente, não existe reabsorção de água no túbulo distal convoluto, na presença ou não do hormônio antidiurético (HAD) (Greger, 1985; Haas, 1989; Kaplan & cols., 1996; Dantzler, 2003).

O ducto coletor cortical e o medular reabsorvem aproximadamente 7% do NaCl filtrado, a reabsorção de Na^+ é eletrogênica, pois esse íon difunde-se da luz tubular para o interior da célula “principal” do ducto coletor, através de canais sensíveis ao amilorida, diurético poupador de potássio, localizados na membrana luminal, a favor tanto de um gradiente químico como elétrico. Ao contrário dos outros segmentos do néfron, o ducto coletor reabsorve Na^+ em atendimento às necessidades do organismo, um ajuste fino (Vincigerra et al., 2004), e não em função da quantidade de Na^+ que lhe é oferecida. A reabsorção de Na^+ neste segmento é regulada pela ação da aldosterona. Nesses segmentos, o epitélio é classificado como epitélios *tight*, ou de baixa permeabilidade. A permeabilidade à água varia diretamente com a concentração plasmática do hormônio antidiurético, que aumenta a permeabilidade à água desses segmentos, permitindo que a água passe, a favor do gradiente de concentração, da luz tubular para o interstício peritubular hipertônico, reabsorvendo uma quantidade variável de água (entre 8 a 17%) (Breyer & Ando, 1994; Hebert, 1999).

As células do ducto coletor reabsorvem quantidades significativas de Cl^- , provavelmente através da via para-celular. A reabsorção de Cl^- é movida pela diferença de voltagem através do túbulo distal e do ducto coletor.

Por outro lado, além dos fatores clássicos (fator natriurético atrial, aldosterona e hormônio antidiurético) que estão relacionados com a regulação do volume e da composição salina do fluido extracelular, outros hormônios vêm se destacando nesse papel fisiológico, como os hormônios sexuais femininos, que incluem o estrogênio e a progesterona (Stachelfeld et al., 1999). Seus receptores podem ser encontrados nos túbulos renais

(Mosselman et al., 1996; Dubey & Jackson, 2001) e estão envolvidos na regulação de sódio, de potássio e de cálcio (Brunette & Leclerc, 2001; Brunette & Leclerc, 2002).

O estrogênio participa da modulação do equilíbrio de sal e de água do organismo (Stachenfeld et al., 1999), por efeitos diretos nos túbulos proximal e distal (Verlander et al., 1998; Brunette & Leclerc, 2001; Stachenfeld et al., 2003), via uma grande expressão de seus receptores α e β (Sharma and Thakur, 2004). Ou indiretamente, modulando o sistema renina angiotensina-aldosterona, diminuindo a atividade da renina plasmática e a enzima conversora de angiotensina (Suelly et al., 2004). É observado um aumento na retenção de água e de sal no organismo pela ação da angiotensina II, concomitantemente com um aumento nos níveis de aldosterona e de progesterona (Sealy et al., 1994; Stachenfeld et al., 2005), sugerindo uma ação progestogênica não específica na competição com a aldosterona pelos receptores de mineralocorticóides ao longo túbulo distal. Sugere-se um mecanismo compensatório, que estimula uma maior formação de angiotensina II, bem como de aldosterona nesse modelo (Myles & Funder, 1996).

As ações do estrogênio, normalmente, são mediadas por dois tipos de receptores, que são conhecidos como receptores de estrogênio (RE) que são geneticamente diferentes, são os receptores, RE α (alfa) e RE β (beta) (Katzenellenbogen et al. 2000; Hall et al., 2001; Gustafsson, 2003), que possuem uma distribuição vasta em vários órgãos do indivíduo (Kuiper et al., 1997). Eles são membros da superfamília de receptores nucleares, com ações regulatórias variadas na transcrição gênica, no citoplasma e na

membrana celular (Nadal et al., 2001). Quando ligados ao hormônio, esses receptores sofrem rearranjos conformacionais, levando a formação de homo ou heterodímeros de RE α e RE β . Ativados, interagem, com alta afinidade, diretamente com regiões específicas do material genético da célula, isto é, genes específicos, chamados de elementos responsivos do estrogênio, como promotores ou, indiretamente, através de interações protéicas com fatores de transcrição (Hall et al., 2001), que podem ativar/ e ou inibir a transcrição gênica. Contudo, parece que o RE α é mais potente ativador que o RE β em indivíduos adultos. Nos rins de camundongas em idade reprodutiva, há uma maior expressão da proteína dos RE α , se comparada à expressão da proteína do RE β (Carley et al., 2003). Assim, a resposta dependente do estrogênio, pode ser expressa pela presença de um de seus subtipos de receptores no tecido alvo em questão (Turgeon et al., 2004).

Estudos vêm mostrando que os esteróides femininos regulam a expressão de diferentes transportadores em diferentes tecidos do organismo. Em pulmão, o estrogênio combinado com a progesterona aumentam a expressão de canais epiteliais de Na⁺ (ENaC) e de cloreto reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (Johannesson M, et al., 2000). O estrogênio e a progesterona modulam de forma diferenciada a expressão do RNAm das subunidades do canal epitelial de Na⁺ em rins de ratas em idade reprodutiva (Gambling et al., 2004). *In vitro*, o estrogênio aumentou a expressão do co-transportador NaCl e da Na⁺-K⁺-ATPase em células de túbulos distais de ratos (Tran et al., 2001), já a progesterona aumentou captação de Ca⁺² de forma não genômica (rápida)

em cultura celular de túbulos proximais de coelhos (Brunette and Leclerc, 2002).

Outra protéica importante na reabsorção de sódio ao longo do néfron, é a Na^+/K^+ -Adenosina-trifosfatase (Na^+/K^+ -ATPase), que é uma proteína transmembrana com função transportadora e catalítica, que mantém o gradiente eletroquímico de Na^+ e de K^+ através da energia liberada pela hidrólise do ATP (Fedosova and Esmann, 2007). Quando ativada funcionalmente, ela transporta 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular, gerando um efluxo ordenado resultante de cargas positivas para o meio extracelular, por isso é dita como eletrogênica (Or et al., 1996). Nas células dos mamíferos, é composta basicamente, por duas subunidades, a alfa (α) com aproximadamente 113kDa, formada por 10 domínios transmembrânicos, sítios de interação com o ATP, com os íons Na^+ e K^+ e de fosforilação, possuindo três isoformas (α_1 , α_2 e α_3). A segunda subunidade é a beta (β) com aproximadamente 35kDa e apenas um domínio transmembrânico, sendo essencial para a atividade do complexo protéico e possuindo quatro isoformas (β_1 , β_2 , β_3 e β_4) (Mobasher et al., 2000). A bomba funcional requer a presença de ambas às subunidades, formando um dímero $\alpha\beta$ (Fedosova and Esmann, 2007), mas considerando sua importância fisiológica, pouco se sabe sobre a cinética e a distribuição tecidual dessas isoformas. Adicionalmente, ao lado dessas subunidades, outros pequenos peptídeos, como o FXD5 (Lubarki I et al., 2007), que atravessam a membrana apenas uma vez, interagem com a bomba. O primeiro deles a ser identificado, foi denominado subunidade

gama (γ) e, é um peptídeo hidrofóbico de cerca de 7kDa que no rim colocaliza-se com a subunidade alfa (Lubarki et al., 2007).

No tecido renal, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ se encontra na membrana basolateral dos segmentos do néfron, gerando o gradiente eletroquímico para o transporte vetorial de sódio (Feraille and Doucet, 2001), merecendo destaque o ajuste fino desse íon no ducto coletor (Vincigerra et al., 2004). Trabalhos mostram que sua regulação é multifatorial, incluindo hormônios, como aldosterona e vasopressina (Gonin et al., 2001), fatores parácrinos, como a adenosina (Wengert et al., 2007), a concentração de sódio intracelular e a osmolaridade extracelular (Feraille and Doucet, 2001, Feraille et al., 2003). A sua modulação crônica pode alterar a expressão da proteína de suas subunidades, já sua modulação aguda pode modificar a redistribuição/ reciclagem da proteína-enzima entre a superfície celular e o meio intracelular, por influência na fisiologia da reciclagem vesicular do aparelho de Golgi (Vincigerra et al., 2003).

Recentemente, muitos trabalhos têm mostrado que os esteróides femininos participam da modulação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em diferentes tecidos (Aperita et al., 1981; Monteiro et al., 2007; Morril et al., 2008; Liu et al., 2007). Em ratos com 20 dias de vida, o tratamento com estrogênio aumentou a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em células de túbulos proximais em desenvolvimento (Aperita et al., 1981). Já no trabalho de Monteiro et al., 2007 a ovariectomia bilateral aumentou a atividade da bomba no hipocampo de ratas em idade reprodutiva. Embora, a reposição estrogênica com doses variando entre 1, 100 e 1000 nmol/L tenham diminuído tanto a expressão, quanto a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Já o trabalho de Tran et al., 2001 que

mostrou *in vitro* que o estrogênio aumenta a expressão da proteína $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em células de túbulos distais de ratas. O tratamento com a progesterona pode atenuar ou não influenciar de forma direta em sua atividade, isso foi demonstrado no trabalho de Morril et al., 2008, em que o tratamento com a progesterona apresentou resultados similares de atividade, ao tratamento com a ouabaína, um inibidor conhecido da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, sugerindo assim que a progesterona pode se ligar a um sítio inibitório da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Morril et al., 2008). Como o estrogênio e a progesterona participam da regulação do balanço de sal e de água no organismo por vários mecanismos, e o rim é o principal órgão responsável por esse equilíbrio, ***será que um desses mecanismos não seria a modulação da expressão e da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no tecido renal de ratas fêmeas em idade reprodutiva?***

Em 1989, foi clonado em células de retina (cones e bastonetes) o canal de sódio sensível a amilorida, pertencente à família dos canais dependentes de GMP cíclico, *cyclic nucleotide-gated channel* (CNG), denominado CNGA-1, que tem função comprovada na transdução de sinais sensoriais do olfato e da visão (Kaupp et al., 1989).

O canal de sódio CNGA-1 é uma proteína expressa no tecido cardíaco, (Ahmad et al., 1990), no pulmão, no fígado (Ding et al., 1997), na musculatura esquelética (Feng et al., 1996) e testicular (Shi F and Wang T, 2005). A sua presença no tecido renal tem sido questionada ou não determinada de forma convergente pelos diferentes métodos, pois apenas por reação em cadeia de polimerase (PCR) e *Northern blotting* apresentaram alguns resultados positivos (Ding et al., 1997), embora outros trabalhos não conseguiram detectá-lo (Zhang

et al. 1997), nem por *Western blotting* ou por imunohistoquímica (Ding et al., 1997). ***Será que a proteína desse canal de sódio é realmente encontrada no rim de mamíferos? Se encontrada, ela possui algum papel na fisiologia renal desses animais?***

O transporte do sódio através de canais sensíveis a amilorida, no túbulo renal, tem comprovado papel na regulação do volume do fluido extracelular e da pressão sanguínea (Cowley & Roman, 1996; Garty & Palmer, 1997). Dentre esses canais o papel clássico é referido ao canal epitelial de Na^+ , ENaC, expresso no ducto coletor e inibido pela amilorida.

Por outro lado, é proposto em alguns trabalhos que as isoformas dos canais CNG possam ter um papel importante ao longo do néfron, como demonstrado em cultura celular de ducto coletor medular interno (Vandorpe et al., 1997), ou em rins de ratos, que expressam o RNAm e a proteína da isoforma CNG3-A (Noivara et al., 2004). Os canais dessa grande família CNG possuem uma estrutura heterotetramérica consistindo de subunidades proteicas “principais” e proteicas “modulatórias” (Richards & Gordon, 2000; Bradley & cols., 2005). As subunidades principais se caracterizam pela habilidade de induzir a formação/ conformação funcional do canal, expressa em sistemas heterólogos. No entanto, as subunidades modulatórias somente são co-expressas com a subunidade principal, conferindo a esses canais um arranjo protéico que conferirá as propriedades nativas dos canais pertencentes a família dos CNGs. Trabalhos têm demonstrado que esses canais possuem um aumento da sensibilidade/ possibilidade de ativação a nucleotídeos cíclicos, como o AMPc e o GMPc. (Biel et al., 1996; Biel et al., 1999).

Assim, os canais da família dos CNGs presentes nas células dos mamíferos estão divididos em duas diferentes subfamílias. A sub-família dos canais representada pelas sub-unidades principais, designadas CNGA-1, CNG-A2, CNG-A3 e CNG-A4, sendo que o CNG-A4, encontra-se dentro desta família, mas sem capacidade de induzir a formação/ conformação funcional do canal (freqüentemente denominada sub-unidade modulatória), e a segunda sub-família desses canais é compreendida por dois membros, o CNG-B1 e o CNG-B3, denominados de sub-unidades modulatórias (Kaupp & Seifert, 2002).

O canal de sódio CNGA-1 é uma proteína de aproximadamente 63 kDa (Molday et al., 1991), embora outros trabalhos apresentem os seus peso molecular em torno de 79,6 kDa, contendo cerca de 690 resíduos de aminoácidos (Ding et al., 1997; Shi F and Wnag T, 2005). Essa discrepância no tamanho e peso molecular pode ser devido à ausência/ presença de 92 resíduos de aminoácidos (Kaupp and Seifert, 2002), que pode ser encontrado em células sensoriais olfatórias humanas, de camundongo, de rato e de porco (Molday et al., 1992). Além disso, o canal de sódio CNGA-1 pode ser glicosilada no resíduo N327. A glicosilação ou a não glicosilação pode alterar o peso molecular do canal em 2kDa (Wohlfart et al., 1992). Trabalhos demonstram que o canal de sódio CNGA-1 é formado por 6 domínios transmembranais (TMDs), sendo que o poro funcional do canal, parece que está localizado entre os domínios 5 e 6. Ambos grupos NH₂ (N) e COOH (C) terminais contêm regiões funcionais para a regulação dess canal. O sítio de ligação de nucleotídeos cíclicos, isto é, AMPc e GMPc, está localizado na região C terminal e, o sítio de ligação ao íon Ca⁺⁺, bem como

o sítio de ligação ao cálcio-calmodulina, localizado na região N terminal da estrutura proteína do CNGA-1.

No entanto, estudos não demonstraram ainda se a proteína do canal de sódio CNGA-1 está expressa ao longo das membranas das células dos néfrons dos rins. Mais recentemente, estudos realizados em rins de ratos submetidos a dietas hipo e hipersódicas demonstraram que a isoforma do canal de sódio CNG-A3 estão expressas nas membranas lumbais das células da alça ascendente espessa de Henle e nas células do ducto coletor cortical, sendo moduladas pela ação da aldosterona, participando da reabsorção de Na^+ ao longo dos néfrons desses animais (Noivara et al., 2004). ***Contudo, ainda nenhum estudo foi realizado com a proteína do canal de sódio CNG-1A em tecido renal para determinar a sua localização e sua função, isto é, a localização da expressão de sua proteína em qual segmento tubular do néfron, bem como a possível função destes canais nesse epitélio tubular, assim como, investigar a influência dos esteróides femininos em sua modulação.***

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Investigar a ação dos hormônios sexuais femininos, de forma isolada, sobre a função renal, por meio da avaliação das alterações na expressão da proteína da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 renais.

Objetivos específicos

-Verificar o efeito da deficiência do estrogênio e da progesterona, de forma isolada, sobre a expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ no córtex e na medula renais, bem como a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1.

-Verificar o efeito da deficiência do estrogênio e da progesterona, de forma isolada, sobre a expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ no córtex e na medula renais.

-Verificar o efeito da deficiência do estrogênio e da progesterona, de forma isolada, sobre a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 no córtex e na medula renais.

-Verificar o efeito do estrogênio sobre a expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em cultura de células de túbulo proximais de ratos.

-Verificar o efeito do estrogênio sobre a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em cultura de células de túbulo proximais de ratos.

-Verificar a localização da expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 ao longo do néfron de ratas controle.

MATERAIS E MÉTODOS

1- Animais experimentais

Foram utilizadas ratas adultas da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) com peso variando entre 200–250 g, provenientes e mantidas pelo biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, RJ, Brasil. Neste experimento os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente com temperatura (20-24°C) e iluminação artificiais controladas de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa (FINEP). As gaiolas permitiram o livre acesso dos animais à ingestão de água e ração.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia de quetamina (30 mg/kg, via intraperitoneal) e xilazina (3 mg/kg, via intraperitoneal) e, ao término da cirurgia receberam antibiótico (Enrofloxacina 25mg/ml), por via intramuscular. Os animais foram pesados no início e no final dos tratamentos.

2- Grupos experimentais

Os animais foram separados, pesados e divididos nos seguintes grupos experimentais:

- ♦ grupo controle-SHAM (CON, n=4);
- ♦ grupo ovariectomizado (OVX, n=12);

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tiveram 10 dias para sua recuperação. No décimo dia, o grupo ovariectomizado foi separado em três subgrupos, isto é, um somente ovariectomizado, um com reposição estrogênica e o outro, com reposição progestogênica. De maneira que no final do décimo dia, os grupos experimentais foram os seguintes:

- ◆ grupo controle-SHAM (CON, n=4);
- ◆ grupo ovariectomizado (OVX, n=4);
- ◆ grupo OVX+ estrogênio (OVE, n=4);
- ◆ grupo OVX+ progesterona (OVP, n=4);

3. Protocolos experimentais

• Ovariectomia bilateral

Após a anestesia, as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele e celular subcutâneo, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura das tubas uterina e remoção dos ovários, de acordo com Moyses et al., 2001. Depois a cavidade peritoneal foi suturada e a região limpa com gaze e a pele fechada com linha de náilon preta.

• Reposição hormonal

No final do décimo dia de recuperação iniciou-se a reposição com os hormônios sexuais femininos de forma isolada, com o 17- β -estradiol (OVE,

2µg/Kg peso corporal, Sigma, St. Louis, Mo., USA) e com o progesterona (OVP, 1,7mg/Kg peso corporal, Sigma, St. Louis, Mo., USA), de acordo com Moyses et al., 2001. Esses hormônios foram diluídos em óleo de milho filtrado (veículo) e, administrados nos animais através de injeções subcutâneas diárias em mesmos horários, por 10 dias consecutivos. Assim, no final o experimento, o grupo OVX foi exposto à ovariectomia por 20 dias.

- **Análise dos parâmetros sanguíneos e urinários (Função renal)**

No décimo dia da reposição hormonal, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais (Insight), em que se analisaram os parâmetros urinários e sanguíneos, de acordo com Ornellas et al, 2002 e, Noivara et al., 2003. Para tanto, foram coletadas amostras de urina e de sangue, no período de 24h, no momento do sacrifício de cada grupo experimental. Com essas amostras coletadas foram dosadas as concentrações plasmáticas e urinárias de potássio (K^+), sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), uréia (U) e creatinina (Cr), para calcularmos o ritmo de filtração glomerular (RFG) e a fração de excreção (FE) de cada um deles, de acordo com as seguintes fórmulas: $FE(\%) = [(U_x \times V) / (GFR \times P_x)] \times 100$ and, $RFG = (U_{cr} \times V) / P_{cr}$, em que U_x , concentração urinária do eletrólito (mg/ml), P_x , concentração plasmática do eletrólito (mg/ml), U_{cr} , concentração urinária de creatinina (mg/ml), P_{cr} , concentração plasmática de creatinina (mg/ml) e V , fluxo urinário ($ml \times min^{-1}$).

- **Dosagem Hormonal**

Após a avaliação da função renal, parte do plasma coletado foi utilizada para a dosagem sérica de estrogênio (pg/mL) e de progesterona (ng/mL) por quimiluminescência, avaliando a eficácia da ovariectomia bilateral e da reposição hormonal dos grupos analisados, de acordo com Eckert, 1999.

- **Excisão Renal**

Todos os animais utilizados nesta tese foram sacrificados por eutanásia, com doses elevadas de anestésicos (quetamina e xilazina), cerca de três vezes mais, que o mínimo para sua anestesia, e submetidos à laparotomia para excisão do rim esquerdo e direito. Inicialmente os rins foram perfundidos com 20 ml de solução salina 0,9% com auxílio de um cateter de polietileno (PE-50) inserido na aorta abdominal. Depois de removido, os rins foram decapsulados manualmente e colocado em uma placa de Pétri estéril, sobre gelo, contendo solução salina. Nesse momento foi realizada identificação do córtex e da medula renais, utilizando uma lupa. A dissecação foi realizada com micrótomo, e imediatamente iniciou-se o procedimento de extração de proteína total e de membrana dos mesmos.

4. Immunoblotting (Western blotting)

Com o intuito de determinar a expressão da proteína codificadora da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 em córtex e medula de ratas utilizamos a técnica de *Western blotting*. A expressão da proteína da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 em córtex e medula de ratas controle, submetidos à ovariectomia bilateral e à reposição hormonal foram

comparadas por immunoblotting. Utilizamos anticorpos específicos para as proteínas dos referidos genes. No caso da proteína da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi utilizada um peptídeo sintético que reconhece especificamente a sua subunidade alfa 1 (Amersham, Buckinghamshyre, UK). Para o canal de sódio CNGA-1 foi utilizado um anticorpo de policlonal coelho anti-CNGA-1 que reconhece o domínio N-terminal do CNGA-1 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA) como descrito por Ding et al., 1997. Utilizamos a expressão da proteína β -actina para nosso controle interno, tanto na expressão da proteína da bomba, quanto na expressão da proteína do canal, e para analisar a sua expressão, foi utilizado um anticorpo monoclonal rato anti- β -actin (Novus Biologicals, Littleton, CO 80160, USA).

O córtex e a medula das ratas foram homogeneizados em uma solução contendo 250 mmol/l de sacarose, 1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l de imidazol, pH 7.2, e os seguintes inibidores de protease: 1 mmol/l 4-(2-aminoetil)-benzosulfonila fluorado, 1 mmol de benzamida, 10 mg/l de leupeptina, 1 mg/l pepstatina A, 1 mg/l aprotinina, e 1 mg/l de quimiostatina. O homogenato foi centrifugado a 1000g por 10min. O sobrenadante foi retirado, e o pellet foi suspenso em três volumes da mesma solução, e a centrifugação foi repetida. Ambos os sobrenadantes foram centrifugados a 10.000g por 20 min para separação da fração mitocondrial e o sobrenadante contendo a proteína total e a concentração das proteínas foi obtida utilizando-se o reagente de Bradford, e a albumina bovina usada como padrão (Bradford, 1976). O sobrenadante formado foi centrifugado a 100.000 g por 1 h, e o pellet contendo as membranas celulares foi suspenso em tampão de homogeneização e a concentração das proteínas foi obtida utilizando-se o

reagente de Bradford, e a albumina bovina usada como padrão (Bradford, 1976). Os extratos foram solubilizados aquecendo a 95°C por 2 min em solução tampão (15 g/l SDS, 10 mmol/l Tris-Cl pH 6.8, 6 g/l DTT, e 60 ml/l de glicerol). As proteínas (100µg para Na⁺-K⁺-ATPase e canal de sódio CNGA-1) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão salino (TBS-T) contendo 5% de caseína (136,8 mmol/L NaCl; 74,5 mmol/L KCl; 24,8 mmol/L Tris base; pH 7,4; 0,5% (V/V) T233n 20; 50g/l leite em pó desnatado) (Sambrook et al, 1989) e incubadas ou com anticorpo contra a proteína da Na⁺-K⁺-ATPase e do canal de sódio CNGA-1 na diluição de 1:500 por 1 hora à temperatura ambiente em tampão TBS-T 3% de caseína (136,8 mmol/L NaCl; 74,5 mmol/L KCl; 24,8 mmol/L Tris base; pH = 7,4; 0,5% (V/V) T233n 20; 30g/l leite em pó desnatado) (Sambrook et al, 1989). Incubações seqüenciais foram realizadas utilizando anticorpos secundários específicos para os anticorpos primários, no caso Na⁺-K⁺-ATPase e canal de sódio CNGA-1, o anticorpo secundário utilizado foi o goat anti-mouse IgG e goat anti-rabbit IgG, respectivamente. A revelação do imunoblotting da Na⁺-K⁺-ATPase foi realizada com ECL Plus (Amersham, Buckinghamshyre, UK) e do canal de sódio CNGA-1 com a fosfatase alcalina. Utilizamos o padrão de peso molecular de proteína (Sigma Chemical, St. Louis, MO) para assegurar uma eletroforese e uma transferência de proteínas adequadas.

5. Medida da atividade ATPásica

Com o intuito de associar a expressão da proteína codificadora Na⁺-K⁺-

ATPase com a sua funcionalidade enzimática foi realizada a quantificação de sua atividade ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPásica. Para tanto, após a homogeneização do tecido renal dissecado (córtex e medula), alíquotas foram retiradas para a mensuração da atividade ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPásica em cada grupo experimental. A composição do meio de reação para medir a atividade ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPásica, em volume final de 0,1ml, foi: MgCl_2 10mM, ATP 5mM (atividade específica de aproximadamente 10^4Bq/nmol), 20mM Hepes-Tris (pH= 7,0), NaCl 90mM, e KCl 30mM.

A atividade ATPásica foi medida pelo método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981). A reação foi iniciada com a adição da fração microssomal de córtex e de medula renais de rata (concentração final de proteína: 0,3mg/ml). A reação foi parada após 20 minutos pela adição de 0,5ml de carvão ativo por HCl (0,1N). O $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ liberado foi medido em alíquotas do sobrenadante, obtidas após a centrifugação da suspensão de carvão a 2000 rpm, por 5 minutos em centrífuga clínica. A radioatividade foi determinada por cintilação líquida (packard Tri-Carb 2100 TR).

O cálculo da atividade $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPásica foi obtido pela diferença de $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ liberado na ausência e na presença de ouabaína 0,1mM (inibidor específico da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase), (Osswad *et al.*, 1978; Vallon 2003; Proverbio *et al.*, 1986). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1956), usando albumina sérica bovina como padrão. Cada experimento foi realizado com no mínimo quatro preparações distintas de fração microssomal de córtex e da medula desses animais.

6. Densitometria

Para quantificar a expressão da proteína codificadora da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 foi realizada a densitometria de suas bandas correspondentes, após a revelação nas diferentes situações descritas, com a utilização de programa de análise computacional (Scion Image corporation, gel analysing software, USA). Os valores obtidos para o gene da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 foram padronizados com o controle interno da $\beta\text{-Actina}$.

7. Imunohistoquímica (Imunofluorescência)

Para determinar a localização da proteína do canal de sódio CNGA-1 foi realizada a técnica de imunohistoquímica do tipo fluorescência. Nesse protocolo, esperamos encontrar o segmento tubular, bem como sua posição luminal ou basolateral ao longo do néfron. Para isso, após a anestesia, os rins foram obtidos de ratas fêmeas adultas controles após a perfusão com solução salina 0.9% heparinizada (1 mL/500mL) e com solução de paraformaldeído tamponado 4%. Os rins foram extirpados, isolados, coletados, decapsulados, cortados em cortes transversais, criopreservados em soluções crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) e congelados a -70°C . Cortes de 6 μm foram obtidos e fixados em acetona gelada por 5 minutos. Após a fixação dos cortes nas lâminas, elas foram lavadas rapidamente em tampão salino-fosfato 0,01M (PBS), pH 7.4, e incubadas em câmara úmida com solução de bloqueio contendo albumina sérica bovina (BSA) 5%, soro normal de cabra 3% em PBS 0.01M pH 7.4 por 1 h em temperatura ambiente, seguida de soluções de avidina e de biotina (Vector biotin

blocking kit, SP-2001, Vector Laboratories INC., Burlingame, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário (rabbit anti-CNGA-1, Sigma Immunochemicals, St Louis, USA, diluído: 1:20 em PBS contendo BSA 3%, Triton X-100 0.1% e Tween 20 0.05%), “overnight” em 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes de 5 minutos em PBS em temperatura ambiente e foram incubados com anticorpo goat anti-rabbit IgG conjugado a um Alexa 586 (A11010, Molecular Probes, USA; diluição: 1: 200 Carlsbad, California) em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Para a marcação da porção tubular do néfron em que se localiza a proteína do canal de sódio CNGA-1, utilizamos a lectina biotinilada *Dilochus biflorus* lectin (DBA) que reage especificamente com a região do túbulo proximal convoluto e do ducto coletor (Zolotnitskaya Anna, and Lisa M. Satlin, 1999) e lectina biotinilada *Arachis hypogaea* (PNA) que reage especificamente com a região do túbulo coletor distal e do ducto coletor (Shepard M et al., 2002), na concentração de 15 µg/mL (DBA- B-1035; PNA – BA-2301-2, Vector Laboratories) por 2h em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com estreptavidina conjugada a FITC (SA-1001, Caltag, Burlingame, CA, USA; diluição: 1:100) por 1h em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes de 5 minutos em PBS em temperatura ambiente e, incubados com DAPI (diluição: 1 µg/ 100 µL) para a marcação nuclear, e montada em lâminas de fluorescência com Vectashield (H-1000, Vector Laboratories). As imagens foram adquiridas usando microscópio de fluorescência Nikon E-800 equipado com a câmera Evolution VF (MediaCybernetis). Todas as resoluções, filtragens,

movimentação e aquisição das imagens dos cortes renais obtidas foram controladas e filtradas pelo programa ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

8. Cultura de células imortalizadas de túbulos proximais

Nos protocolos de quantificação funcional do canal sódio CNGA-1 (expressão da proteína) e da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (expressão da proteína e medida da atividade) foram utilizados tecidos renais extraídos dos animais após seu respectivo tratamento hormonal. Com o intuito de analisar, de forma isolada, as ações do estrogênio sobre a funcionalidade desses carreadores iônicos de sódio utilizaram um protocolo experimental de cultura celular (*in vitro*) com células de túbulos proximais imortalizadas (IRPTC) fornecidas pela Dra Mello-Aires (Renal Biophysics Laboratory of the Biomedical Science Institute in University of São Paulo, Brazil). As células IRPTC foram mantidas no meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) complementadas com soro bovino fetal 10% (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA), glicose 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml e streptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco BRL, N.Y., USA). Após atingirem 90% de confluência, elas foram incubadas com o meio DMEM sem o soro fetal bovino por 16 h, e tratadas com 17- β -estradiol nas diferentes concentrações de 10^{-11}M , 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M e 10^{-7}M por 24h. Posteriormente, foi realizada a extração e a quantificação da proteína total dessas células IRPTC (forma similar descrita no item 4. Immunoblotting) para analisar a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1. Além disso, analisamos também a expressão da proteína e a atividade ATPásica (forma similar

descrita no item 5. Medida da atividade ATPásica) nos mesmos tratamentos.

9. Análise Estatística

Os resultados encontrados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Para análise dos experimentos com quatro grupos de animais foi realizado o teste ANOVA, uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações *Student-Newman Keuls*. A diferença foi aceita como significativa quando $*p < 0.05$. Utilizamos o programa estatístico GraphPad Prism, 2003.

RESULTADOS

Na avaliação da reposição hormonal com estrogênio e com progesterona (TABELA 1), observamos que grupo ovariectomizado (OVX), que recebeu o óleo de milho como veículo, apresentou uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de estrogênio e de progesterona, $31 \pm 3,0$ ng/mL e $9,3 \pm 3,1$ pg/mL (TABELA 1, $p < 0,01$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle (C, estrogênio: 98 ± 12 pg/mL; progesterona: $18 \pm 2,8$ ng/mL). Após o 10º dia de ovariectomia, o grupo ovariectomizado que foi subdividido em grupo ovariectomizado repostado com benzoato de 17 β -estradiol (OVE), apresentou uma concentração sérica de estrogênio de $110 \pm 5,8$ pg/mL. Esse valor não foi estatisticamente diferente do grupo controle (C, 98 ± 12 pg/mL) Já o grupo ovariectomizado que foi repostado com progesterona (OVP) apresentou uma concentração sérica de progesterona de $16 \pm 0,7$ ng/mL. Esses valores não foram estatisticamente diferentes do grupo controle (C, $18 \pm 2,8$ ng/mL). O grupo OVE e o grupo OVP apresentaram valores hormonais maiores que o grupo OVX, após sua respectiva reposição hormonal.

TABELA 1. Concentrações séricas de estrogênio e de progesterona.

Grupos	C (n=4)	OVX(n=4)	OVE (n=4)	OVP (n=4)
E₂ (pg/mL)	$98 \pm 12,0$	$31 \pm 3,0^{**}$	$110 \pm 5,8^{##}$	$32 \pm 0,9^{**}$
P₄ (ng/mL)	$18 \pm 2,8$	$9,3 \pm 3,1^{**}$	$10 \pm 0,8^{**}$	$16 \pm 0,7^{##}$

Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs C. ## $p < 0,01$ vs Ovx

Após o 10º dia de tratamento com benzoato de 17 β -estradiol e com progesterona, e, na tentativa de averiguar os efeitos de cada um desses

hormônios nos parâmetros renais, como a fração de excreção (FE), fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular e osmolaridade urinária, que estão representados na TABELA 2. Observamos que a FE do Na⁺ e do Cl⁻ aumentaram significativamente no grupo ovariectomizado (FE_{Na⁺}: 0,21±0,02, p<0.01; FE_{Cl⁻}: 0,61±0,09, p<0.05), quando comparado ao grupo controle. A reposição com benzoato de 17b-estradiol e com progesterona diminuíram esses valores, apresentando resultados similares aos do grupo controle (FE_{Na⁺}: 0,12±0,01; FE_{Cl⁻}: 0,41±0,19). A FE do K⁺, embora não tenha apresentado uma diferença significativa após a ovariectomia (24,2±1,2), vs o grupo controle (25,3±3.0), diminuiu após a reposição com benzoato de 17b-estradiol (10,3±1.2, p<0.01) e com progesterona (11,6±1.2, p<0.01) de forma isolada vs grupo controle (25,3±3.0). O fluxo urinário (0,004±0,002mL/min, p<0.01) e a ingestão hídrica (7,7±1.4mL/dia, p<0.05) diminuíram no grupo ovariectomizado vs o grupo controle (0,01±0,001mL/min; 15,6±1.8mL/dia). A reposição hormonal aumentou esses parâmetros, apresentando resultados similares aos do grupo controle, isto é, com benzoato de 17b-estradiol (fluxo urinário: 0,009±0,002mL/min; ingestão hídrica: 24,4±3,1mL/dia) e com progesterona (0,013±0,001mL/min; ingestão hídrica: 24,5±6,5mL/dia).

Os valores do ritmo de filtração glomerular, da FE da uréia, da osmolaridade urinária e do peso corporal não apresentaram mudanças significantes em relação aos do grupo controle (TABELA 2).

Ao analisarmos a influência da ovariectomia e da reposição hormonal com benzoato de 17b-estradiol e com progesterona, de forma isolada,

TABELA 2. Valores de FE de Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Uréia, fluxo urinário, RFG, ingestão hídrica e peso corporal, dos grupos controle (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado repostado com estradiol (OVE) e repostado com progesterona (OVP) , por 10 dias

Grupos	C (n=4)	OVX (n=4)	OVE (n=4)	OVP (n=4)
FE Na ⁺ (%)	0,12±0,01	0,21±0,02**	0,12±0,01	0,11±0,02
FE K ⁺ (%)	25,3±3,0	24,2±1,2	10,3±1,2***	11,6±1,2**
FE Cl ⁻ (%)	0,41±0,01	0,61±0,01*	0,35±0,08	0,45±0,05
FE Urea (%)	0,69±0,09	0,64±0,09	0,58±0,19	0,41±0,07
Fluxo Urinário (mL/min)	0,01±0,001	0,004±0,002**	0,009±0,002	0,013±0,001
Osmolaridade (mOsm/L)	1544±172	1716±129	1234±159	1332±142
GFR (mL/min)	1,7±0,4	1,5±0,2	1,7±0,4	2,1±0,04
Ingestão Hídrica (mL/day)	15,6±1,8	7,7±1,4*	24,4±3,1	24,5±6,5
Peso Corporal (g)	209±6,0	231±2,4	214±9,0	214±11,0

Valores expressos como média±EPM. . * p<0,05; ** p<0,01 vs do grupo controle.

sobre a expressão da proteína e sobre a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase em rins de ratas, encontramos resultados que demonstram que a ovariectomia bilateral diminuiu significativamente a expressão da proteína da Na⁺-K⁺-ATPase em 30% no homogenato celular (Figura 1 A, p<0,01) e em 44% na fração microsomal (Figura 1B, p<0.01) no córtex renal desses animais, respectivamente. Fato que também foi corroborado com a redução na atividade desta enzima na fração microsomal, do córtex renal desses animais em cerca de 50% (Figura 1C, p<0.05). A reposição com benzoato

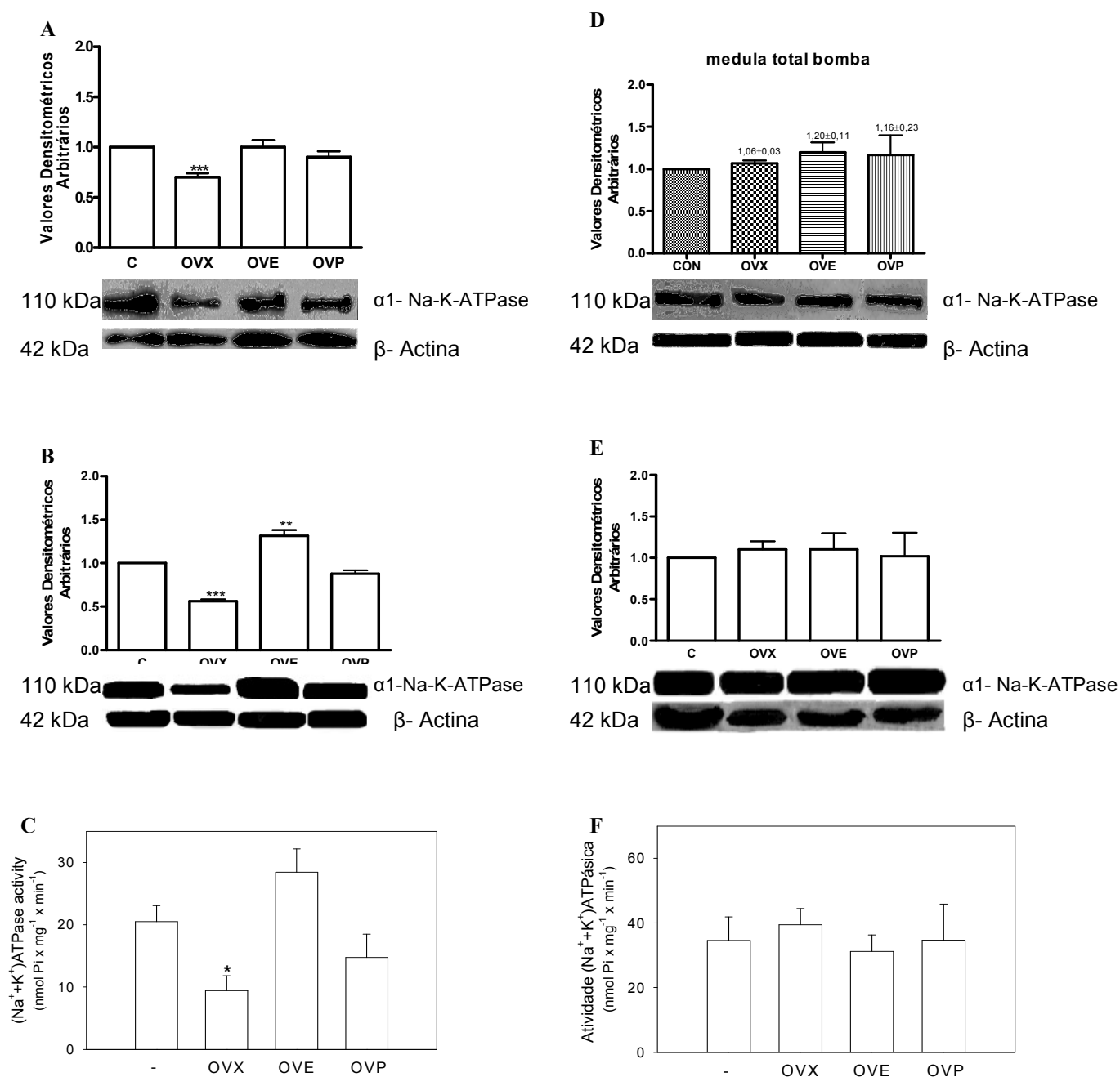


Figura 1. Modulação da expressão da proteína e atividade Na^+K^+ -ATPase em rins de ratas sob diferentes condições. **A** e **B** representam, respectivamente, o imunoblot para α_1 - Na^+K^+ -ATPase na preparação total e microssomal de proteína do córtex renal de animais controle (C, lane 1), ovariectomizado (OVX, lane 2), ovariectomizado repostado com benzoato de 17 β -estradiol (OVE, lane 3) e ovariectomizado repostado progesterona (OVP, lane 4). 100 mg de proteína foram colocadas em cada lane. **C**, representa a atividade da fração microssomal da Na^+K^+ -ATPase do córtex renal. **D** e **E** representam, respectivamente, o imunoblot para α_1 - Na^+K^+ -ATPase na preparação total e microssomal de proteína extraídas da medula renal. **F**, representa a atividade da fração microssomal da Na^+K^+ -ATPase da medula renal. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=4). *P<0.05 vs Controle.

.17b-estradiol por 10 dias consecutivos aumentou sua expressão protéica a um valor similar ao do grupo controle, na preparação do homogenato celular (Figura 1A). Já sua expressão na fração de membrana, observamos um aumento de 30% em relação ao grupo controle ($p < 0,01$).

Sugerindo, uma ação estrogênica mais efetiva na fração de membrana funcional das células do córtex renal desses animais. Na medida da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ na fração de membrana, observamos que após a reposição com benzoato de 17b-estradiol, houve um aumento nesses valores, apresentando resultados similares aos do grupo controle (Figura 1C).

A reposição com progesterona aumentou expressão da proteína da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ a valores similares aos do grupo controle, tanto na preparação de homogenato celular (Figura 1A), quanto na preparação da fração de microsomal (Figura 1B) desses animais. Esse mesmo padrão de resposta foi encontrado nos resultados da medida da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, a reposição com progesterona normalizou seus valores, ficando similares ao grupo controle (Figura 1C).

Já na preparação do homogenato celular (Figura 1D), da fração microsomal (Figura 1E) e na medida da atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Figura 1F) da região medular desses animais não encontramos diferença significativa entre na função da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

Com esses resultados, evidenciamos a influência da ovariectomia bilateral e da reposição hormonal, em especial com benzoato de 17b-estradiol na modulação da expressão protéica e na atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ no córtex renal de ratas em idade reprodutiva. Contudo, esses

resultados não apresentaram o mesmo padrão de resposta na medula renal desses animais, isto é, não apresentaram diferença significativa em relação

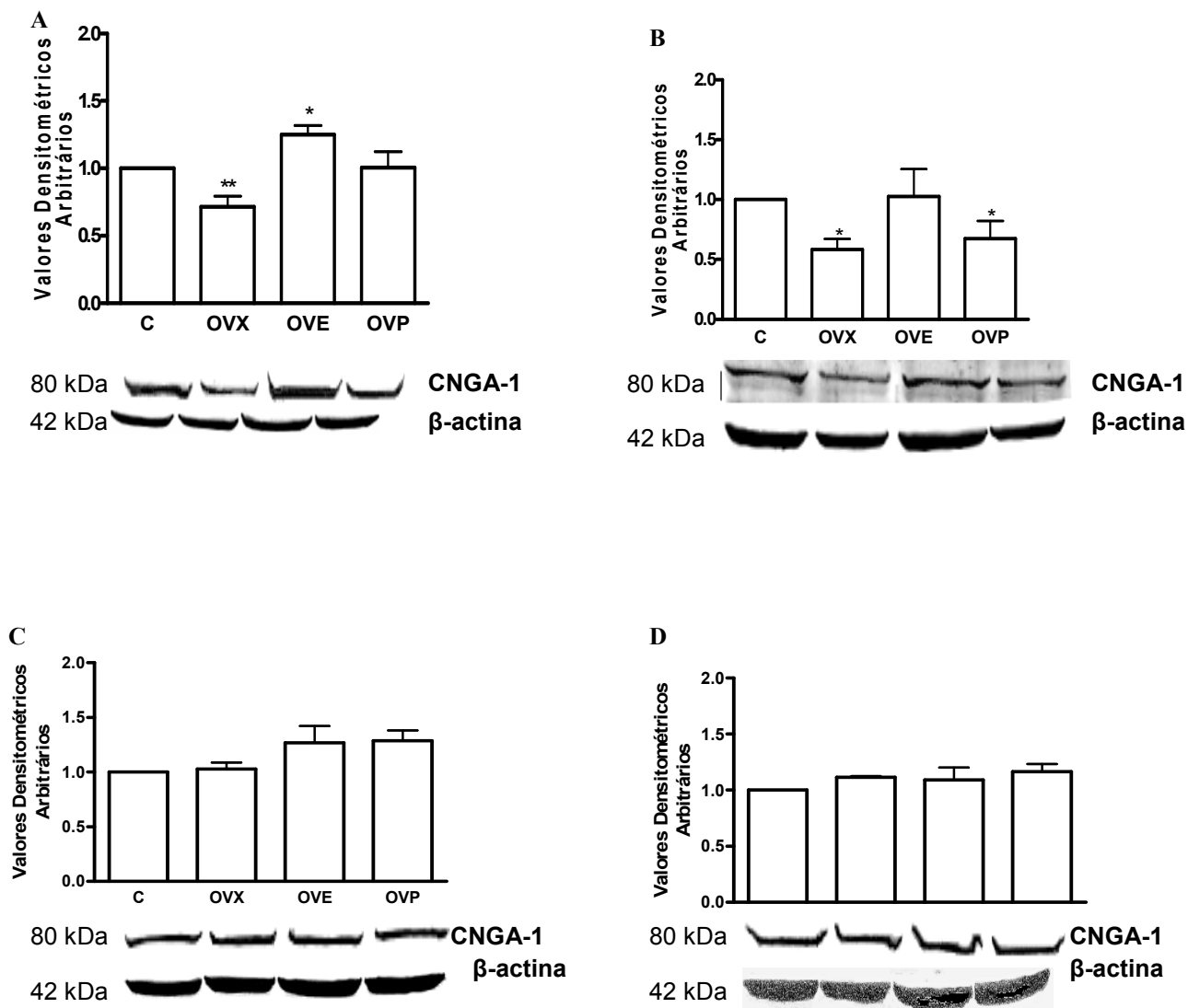


Figura. 2. Expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas sob diferentes condições. **A** e **B** representam o imunoblot para canal de sódio CNGA-1 na preparação micossomal e total de proteína, respectivamente, de córtex renal de animais controle (C, lane 1), ovariectomizado (OVX, lane 2), ovariectomizado repostado com benzoato de 17b-estradiol (OVE, lane 3) e ovariectomizado repostado progesterona (OVP, lane 4). 100 mg de proteína foi colocada em cada lane. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=4). *P<0.05 vs Controle.

ao grupo controle.

Outro carreador de sódio que é foco de nosso estudo é o canal de sódio CNGA-1. Após a ovariectomia bilateral, observamos que expressão de sua proteína diminui significativamente em 30% na preparação do homogenato celular (Figura 2A, $p < 0,01$) e em 42% na preparação da fração microsomal (Figura 2B, $p < 0.05$) no córtex renal desses animais, respectivamente. A reposição hormonal com benzoato de 17 β -estradiol aumentou a expressão da proteína desse canal de sódio a um valor similar ao do grupo controle na preparação da fração microsomal (Figura 2B). Contudo, observamos um aumento significativo na preparação do homogenato das células dos córtices renais desses animais. Fato que foi evidenciado em um aumento de 25% de sua expressão protéica (Figura 2A, $p < 0.05$). Já a reposição com a progesterona não influenciou de forma significativa na expressão da proteína do canal CNGA-1 na preparação do homogenato celular vs grupo controle (Figura 2A).

Apesar disso, encontramos uma modulação negativa significativa de 33% deste hormônio na fração microsomal do córtex renal dessas ratas, em relação ao grupo controle (Figura 2B, $p < 0.05$).

Com esses dados, sugerimos que a ação da ovariectomia bilateral e da reposição com o benzoato de 17 β -estradiol na expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 apresentaram um padrão de resposta similar observada na expressão da proteína/ atividade da Na⁺-K⁺-ATPase em córtex renais de ratas férteis. Isso também foi observado na modulação do canal de sódio CNGA-1 na medula renal dessas ratas, isto é, a ovariectomia bilateral, a reposição com benzoato de 17 β -estradiol e com a progesterona

não influenciaram de forma significativa na expressão da proteína desse canal de sódio e na expressão da proteína/ atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, na preparação do homogenato celular e na fração microsomal. Evidenciando uma ação diferenciada do estrogênio no córtex desses animais.

Como encontramos em nossos resultados uma modulação da função (expressão da proteína e da atividade) da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 apenas no córtex renal de ratas submetidas à ovariectomia e à reposição hormonal com benzoato de 17 β -estradiol, hipotetizamos que essa modulação também ocorra de forma isolada, sem a influência de outros fatores humorais.

Assim, analisamos a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em cultura de células imortalizadas de túbulo proximal de ratos (IRPTC) submetida ao tratamento com concentrações crescentes de benzoato de 17 β -estradiol por 24h. O tratamento nas doses de 10^{-11}M , 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M e 10^{-7}M ocasionaram um aumento na expressão da proteína de 70%, 80%, 80%, 90% e 110%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 3).

Já a expressão da proteína e a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em cultura celular de células IRPTC, com o mesmo protocolo de tratamento descrito acima (24h), com doses crescentes de benzoato de 17 β -estradiol, observamos que as concentrações de 10^{-11}M e de 10^{-10}M de benzoato de 17 β -estradiol não apresentaram modificações significativas na expressão da proteína (homogenato celular, Figura 4A) e na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Figura 4B). Contudo, nas concentrações de 10^{-9}M , 10^{-8}M e 10^{-7}M de benzo-

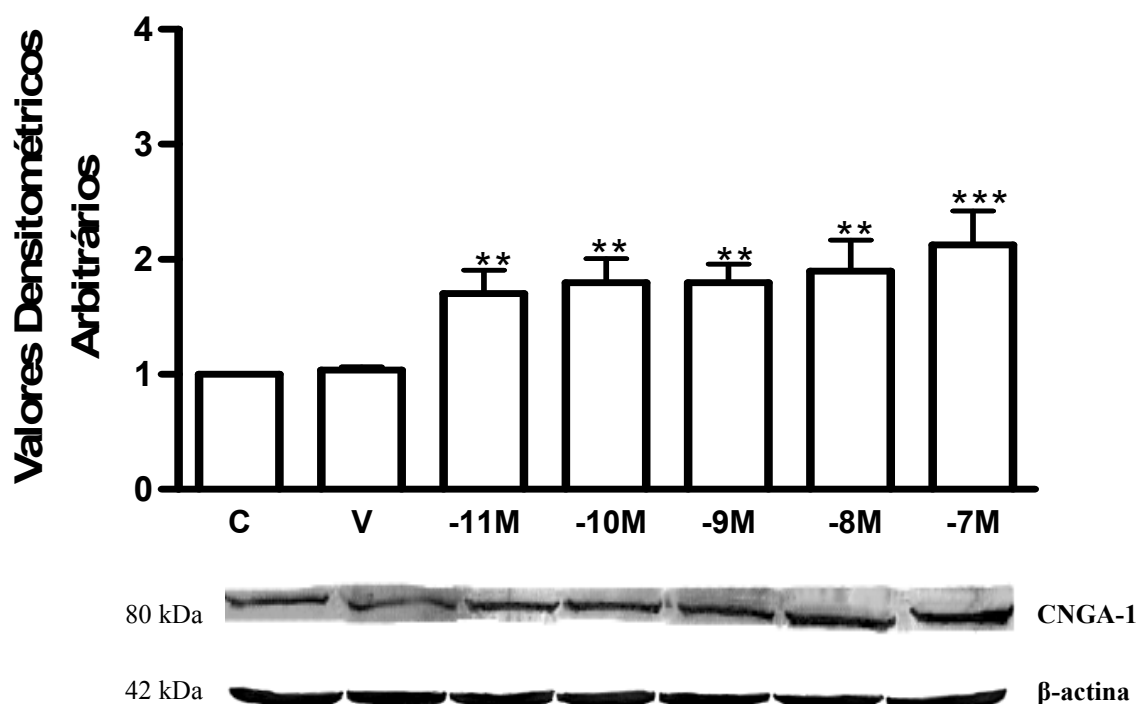


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de benzoato de 17b-estradiol na expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em cultura celular de células IRPT (túbulo proximal de ratos) sob diferentes condições. O imunoblot para CNGA-1 na preparação de proteína total para as células controle (C, lane 1), com apenas o veículo (V, lane 2), tratadas com benzoato de 17b-estradiol a 10⁻¹¹M (-11M, lane 3), a 10⁻¹⁰ M (-10M, lane 4), a 10⁻⁹ M (-9 M, lane 5), a 10⁻⁸ M (-8 M, lane 6) e a 10⁻⁷ M (-7 M, lane 7). 100 mg de proteína foi colocada em cada lane. Os resultados foram expressos como média± EPM (n=4). **P<0.01 e ***P<0.001 vs Controle.

ato de 17b-estradiol encontramos um aumento na expressão de sua proteína de 32,5%, 30% e 120%, respectivamente (Figura 4A). Esse aumento na expressão da proteína, foi corroborado com um aumento na atividade da Na⁺-K⁺-ATPase, isto é, o tratamento com as concentrações de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M e 10⁻⁷M, apresentaram um aumento de 150%, 140% e 130%, respectivamente (Figura 4B)

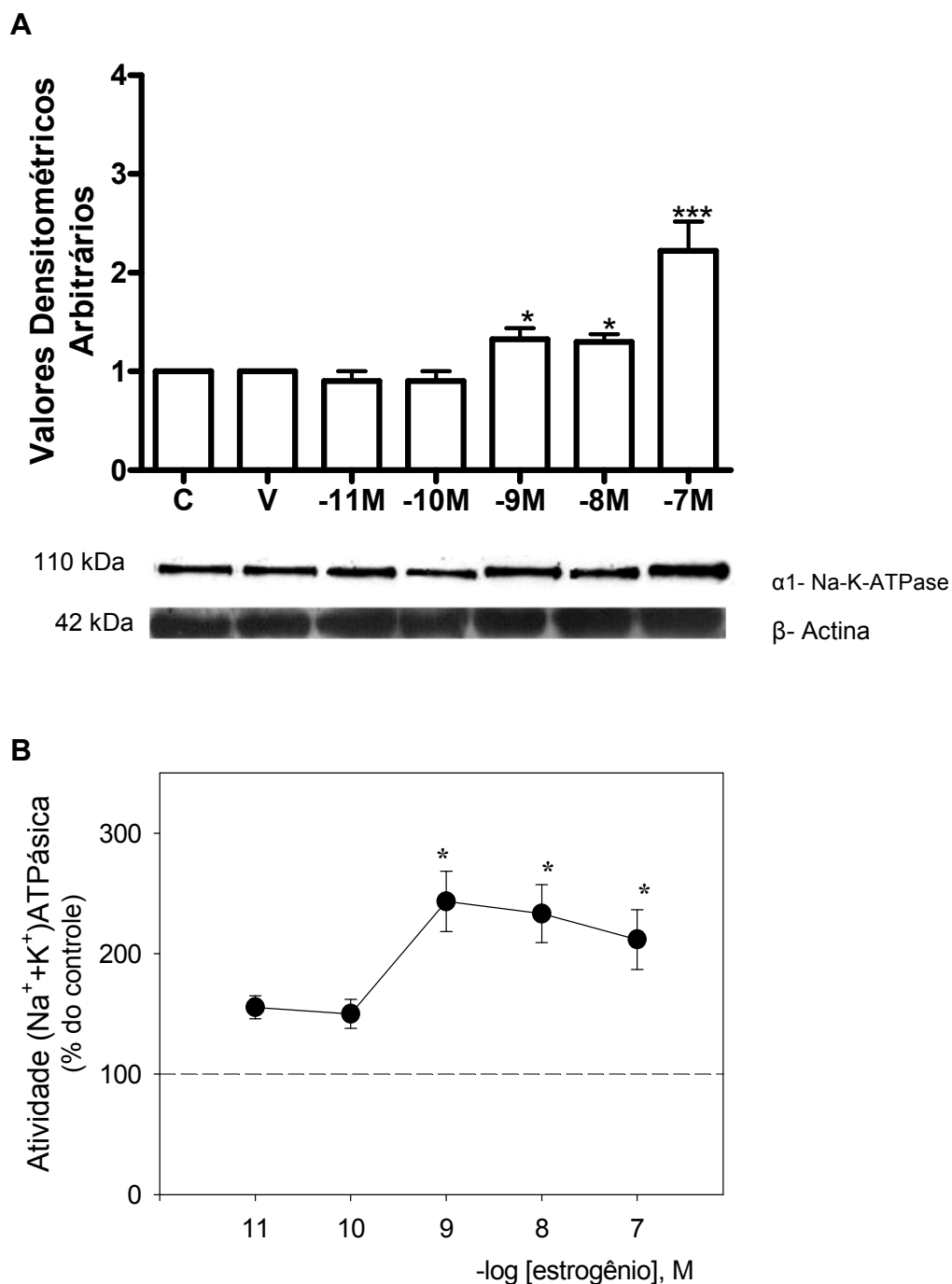


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de benzoato de 17 β -estradiol na modulação da expressão da proteína e da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase em cultura celular de células IRPT (túbulo proximal de ratos) sob diferentes condições. **A** e **B** representam o imunoblot e a atividade, respectivamente, para α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase na preparação de proteína total extraídas de células controle (C, lane 1), com apenas o veículo (V, lane 2), tratadas com benzoato de 17 β -estradiol a 10⁻¹¹M (-11M, lane 3), a 10⁻¹⁰M (-10M, lane 4), a 10⁻⁹M (-9 M, lane 5), a 10⁻⁸M (-8 M, lane 6) e a 10⁻⁷M (-7 M, lane 7). 100 mg de proteína foi colocada em cada lane. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=4). *P<0.05 vs Controle.

E por fim, realizamos o protocolo de imunofluorescência para a localização da proteína do canal de sódio CNGA-1 ao longo do néfron de animais controle, localizando, com marcações específicas, em qual segmento tubular e em qual porção da membrana tubular ele seria expresso.

Observamos que ele é expresso na membrana basolateral, em que foi incubado com anticorpo anti-CNGA-1 e revelado em vermelho (Figura 5A). Ao utilizarmos uma marcação de túbulo proximal com a Lectina DBA, revelada em verde, observamos a localização da marcação porção da membrana luminal (Figura 5B).

Evidenciamos com a sobreposição das imagens, o mergê, que o canal de sódio CNGA-1 é expresso na porção basal do túbulo proximal (Figura 5C). Esse mesmo padrão de localização foi encontrado no túbulo distal, isto é, a proteína do canal CNGA-1 é expressa na porção basal, revelado em vermelho (Figura 5D). Realizando a marcação do túbulo distal com a lectina PNA, revelado em verde (Figura 5E) e a colocalização da imagem, evidenciando sua localização na porção basal no túbulo distal (Figura 5F).

Não encontramos reação imunofluorescente positiva na região medular desses animais. Sugerindo assim, uma maior evidência histoquímica na região cortical do néfron desses animais.

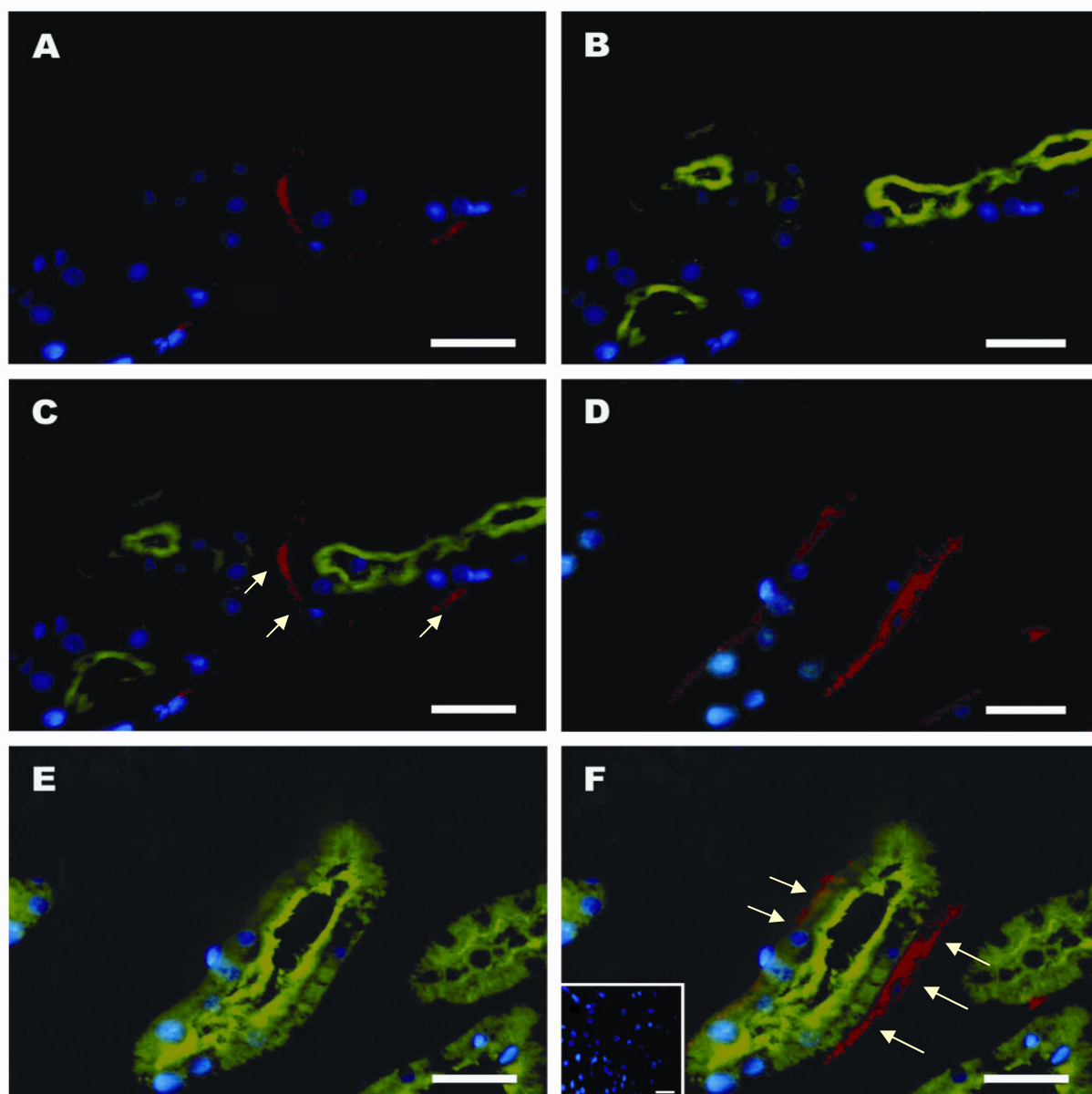


Figura 5. Imunolocalização do canal de sódio CNGA-1 no túbulo distal e proximal do néfron. (A) CNGA-1 é revelado com o anticorpo primário policlonal de coelho a seguido a um anticorpo secundário conjugado ao ALEXA 586. A sua imunoexpressão está presente na região basal (vermelho). (B) Lectina biotilizada DBA seguida da estreptavidina conjugada a FITC, revelada na membrana luminal do túbulo proximal conectivo (verde). (C) Sobreposição – CNGA-1 revelado pelo ALEXA 586 (vermelho) na membrana basolateral túbulo proximal conectivo, detectado pela lectina DBA (verde). (D). CNGA-1 imunorevelado na membrana basal do túbulo pelo ALEXA 586 (vermelho). (E). Túbulo distal conectivo identificado pela lectina biotilizada PNA, revelada com a estreptavidina conjugada a FITC (verde). (F) Sobreposição – CNGA-1 revelado pelo ALEXA 586 (vermelho) na membrana basolateral túbulo distal conectivo, detectado pela lectina PNA (verde). Baras: 20 μm .

Discussão

Neste estudo, verificamos a participação dos hormônios sexuais femininos na modulação da função da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e do canal de sódio CNGA-1 em rins de ratas férteis, bem como a possível contribuição e a localização desse canal na fisiologia dos segmentos tubulares do néfron. Uma de nossas primeiras observações foi o fato da ovariectomia bilateral aumentar significativamente os valores da FE do Na^+ e do Cl^- , afetando diretamente a função renal, na reabsorção de sódio. A reposição com estrogênio e com progesterona, de forma isolada, diminuiu esses valores, os tornando similares aos do grupo controle. Esses resultados foram corroborados pelo trabalho de Stachenfeld et al., 2005, em que a reposição hormonal por 4 dias diminuía a massa de Na^+ urinária em mulheres de 20-30 anos submetidas a menopausa experimental com o antagonista de hormônio liberador de gonadotrofinas. Por outro lado, demonstramos que o fluxo urinário e a ingestão hídrica diários foram reduzidos significativamente pela ovariectomia bilateral. O volume urinário (24h) reduzido está relacionado com a menor ingestão de água por esses animais. A reposição hormonal aumentou esses valores a resultados similares aos do grupo controle. O estrogênio aumenta o estímulo para a sede, como demonstrado por Krause et al., 2003, em que a reposição estrogênica estimulava a ingestão hídrica das ratas, fato que explicaria a normalização dos valores de ingestão hídrica após a reposição com estrogênio.

Muitos outros estudos vêm demonstrando a participação dos esteróides femininos na modulação do fluido extracelular e do equilíbrio de Na^+ corporal (Brunette and Leclerc, 2001; Gambling et al., 2004; Stachenfeld et al., 2005). Essa influência no controle hidrossalino pode ocorrer pela modulação na expressão dos transportadores de eletrólitos em diferentes tecidos corporais.

No pulmão, por exemplo, o estrogênio combinado com a progesterona levaram a um aumento na expressão dos canais epiteliais de sódio amilorida sensíveis (ENaC) e nos canais de cloreto reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (Johannesson et al., 2000). Em células epiteliais glandulares endometriais de cobaias (“guinea-pig”), a progesterona diminuiu a expressão do RNAm do canal de cloreto CFTR (Mularoni et al., 1995). Já em células de ducto pancreático humano, após 20 horas de tratamento com a progesterona, ocorreu um aumento na expressão do RNAm e da proteína do canal de cloreto CFTR. Resultado que não foi observado após o tratamento com estrogênio nas mesmas condições (Sweezey et al., 1996). Nas células de túbulos distais de rins de cães (MDCK), o tratamento com estrogênio aumentou a expressão do RNAm dos co-transportadores de sódio/ sulfatos (Lee et al., 2000). Assim, em nosso trabalho, demonstramos que a ovariectomia bilateral diminui significativamente a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 em preparação de proteínas de membranas e totais no córtex renal. A reposição estrogênica normalizou a expressão das proteínas de membranas e aumentou em 25% a expressão das proteínas totais, respectivamente. Já a reposição com a progesterona reduziu de forma significativa a expressão da proteína do canal de sódio CNGA-1 na preparação de proteínas de membranas e não alterou a expressão do canal na preparação de proteínas totais, respectivamente, no córtex renal. De maneira que há uma modulação diferenciada pelo estrogênio e pela progesterona na expressão da proteína do canal CNG1-A no córtex renal. Contudo, essa modulação não foi evidenciada na medula renal desses animais em nosso modelo experimental, uma vez que a ovariectomia bilateral e/ou as reposições isoladas dos hormônios sexuais

femininos não alteraram de forma significativa a expressão da proteína desse canal de sódio.

A influência direta da ação da progesterona na modulação dos canais de sódio na medula renal, encontrada em nosso trabalho, foi corroborado pelo trabalho de Thomas et al., 2006, em que a administração da progesterona em três doses no período de 36 horas, não alterou significativamente a expressão do RNAm da subunidade alfa do ENaC em rins de camundongos com 30 e com 32 dias de vida. Esse resultado também foi observado *in vitro* após a expressão do RNAm utilizando células de túbulos distais dos rins de cães (MDCK) da linhagem C7.

Essa modulação diferenciada também é observada no trabalho de Gambling e cols. (2004) em que a reposição com estrogênio, durante 8 e 24h aumentou a expressão do RNAm da subunidade α do canal de sódio ENaC (α -ENaC) nas fêmeas ovariectomizadas. O tratamento com a progesterona inibiu esse efeito do estrogênio sobre a expressão do RNAm da α -ENaC, após 8h de sua administração, embora, sua administração tenha aumentado a expressão do RNAm da subunidade γ do ENaC. Além disso, nenhum dos hormônios, administrados separados e/ou combinados alteraram de forma significativa a expressão do RNAm da subunidade β -ENaC após 8 ou 24h de tratamento.

O canal de sódio ENaC está localizado principalmente nas células do túbulo convoluto distal, ducto coletor e ducto coletor cortical (DCC) nos rins dos mamíferos (Schmitt et al., 1999; Biner et al., 2002). Estudos mostram que a atividade deste canal é um fator limitante para a reabsorção de sódio no DCC (Petty et al., 1981). Anormalidades que aumentam atividade do ENaC ao longo do néfron, tais que levam a um

aumento na reabsorção de sódio, na expansão do fluido extracelular e podem gerar hipertensão arterial. Já na síndrome de Liddle (Shimkes et al., 1994), ou a diminuição na atividade do canal, resultam em perda de sal e em hipotensão (Chang et al., 1996). O transporte de sódio é dependente do número de ENaC localizados na membrana epitelial, normalmente, luminal e da frequência com que o sódio é transportado por eles. O canal de sódio ENaC é composto por três subunidades α , β e γ (Canessa et al., 1994), e a abundância do RNAm dessas subunidades é um importante fator determinante da atividade do mesmo. A aldosterona é modulador do RNAm e das proteínas da α ENaC, mas não das outras subunidades no rim de ratos (Stokes et al., 1998; Masilamani et al., 1999).

Essa modulação estrogênica/ progestogênica explicaria a maior excreção de sódio observado no grupo ovariectomizado, já que a ausência hormonal diminuiria a expressão de muitos desses canais e, conseqüentemente, a reabsorção de sódio ao longo do néfron estaria prejudicada, evidenciando desta forma a participação do canal de sódio CNGA-1 na regulação do balanço de Na^+ corporal e, sua importância para a fisiologia renal.

Outro íon importante para a regulação dos fluidos corporais é o cloreto, um ânion predominante do ultrafiltrado glomerular e reabsorvido ao longo do néfron por mecanismos transepiteliais ou paracelulares (Aronson & Giebisch, 1997). O transporte transcelular de cloreto envolve muitas proteínas de membrana, incluindo canais de cloreto expressos ao longo dos túbulos renais (Morales et al., 1996; Uchida, 2000). Estudos prévios elucidam que o canal de cloreto, CIC-2, é membro da abundante família dos

canais de cloreto e foi isolado originalmente no coração e cérebro de rato, além de ser expresso em células epiteliais adultas, incluindo as de rim. Como possui uma expressão elevada no rim, esse canal de cloreto pode ter um importante papel na reabsorção de cloreto ao longo do néfron (Ornellas et al., 2002).

Nascimento e cols. (2003), utilizando rins de ratas *Wistar* mostraram que a ovariectomia ocasionou uma redução na ordem de 28% na expressão do RNAm do CIC-2, quando comparada ao grupo controle. A ovariectomia reduziu a expressão do RNAm do CIC-2 em 42% e 52%, túbulo convoluto proximal (TCP) e no túbulo reto proximal (TRP), respectivamente, fato que explicaria um aumento na FE do Cl^- nas ratas ovariectomizadas de nossos resultados. Quando foi realizado o tratamento com terapia estrogênica de baixa e de alta dose, aumentou na expressão desses canais a valores similares ao controle, e nos TCP e TRP, na ordem de 38 e 86%, respectivamente. Assim, esses resultados sugerem que o estrogênio é um modulador fisiológico da expressão dos canais de cloreto CIC-2, agindo diretamente no túbulo proximal, uma região do néfron responsável por 60% da reabsorção de sal e água do filtrado glomerular (Jacobson, 1981). Essa modulação estrogênica explicaria a excreção de uma urina com uma maior quantidade de íons cloreto no grupo ovariectomizado, já que com a ausência hormonal, haveria uma diminuição na quantidade dos canais de cloreto CIC-2 e, conseqüentemente, uma menor reabsorção destes íons, aumentando a excreção dos mesmos pela urina.

Muitos outros trabalhos suportam a idéia de que uma das ações do estrogênio na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico seja atuando

diretamente nos segmentos tubulares renais, através de diferentes mecanismos de ação celulares (Verlander et al., 1998; Brunette & Leclerc, 2001; Brunette & Leclerc, 2002; Stachenfeld et al., 2003).

Um dos mecanismos seria a ação não-genômico do estrogênio, dependente da ativação da proteína quinase C-delta (PKC δ), que fosforilaria a proteína quinase A (PKA), para ativar o transportador trocador Na⁺/H⁺, aumentando a absorção de sódio em células de colon distal (Harvery et al., 2002). A aldosterona estimularia a proteína quinase C-alfa (PKC α), ativando o mesmo trocador. Além disso, esses dois hormônios esteróides possuem uma via de ação em comum, ativando a enzima fosfolipase-A₂ (FLA₂), que clivaria o ácido araquidônico (AA) presente na membrana celular, e através da via da ciclooxygenase (COX), liberaria as prostaglandinas (PGE₂), para ativar o trocador Na⁺/H⁺, isoforma-3 (NHE-3) aumentando a reabsorção de sódio (Harvery et al., 2002).

O outro mecanismo de ação celular seria via genômica (clássico dos esteróides) através de seus receptores citoplasmáticos e nucleares, alterando a transcrição e tradução gênica da célula (Nadal et al., 2001). Essa forma de ação na fisiologia renal foi demonstrada, no trabalho em que a expressão da proteína do cotransportador NaCl apresentou uma redução de 34% nas ratas ovariectomizadas e, o tratamento com estrogênio, elevou sua densidade em cerca de 60% (Verlander et al., 1998). Esses resultados elucidam o efeito genômico do estrogênio nas células do túbulo coletor distal, aumentando a densidade dos cotransportadores NaCl, devido à presença de seus receptores nessa porção do néfron, possibilitando sua modulação e maior retenção de sódio nessas condições.

A ação estrogênica pode atuar indiretamente na modulação da função renal, como na interação com o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). A interação do estrogênio com o SRAA tem sido demonstrada em vários estudos e em vários tecidos (Oikers, 1996; Ojeda et al., 2007; Pendergrass, et al., 2008; Hoshi-Fukushima et al, 2008). Em um desses estudos, a ovariectomia foi capaz de aumentar a densidade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e a densidade dos receptores AT_1 nos rins de fêmeas Wistar (Gallagher et al., 1999). Apesar de haver uma redução na densidade da ECA pulmonar, principal isoforma de atuação na conversão para o peptídeo angiotensina II. O tratamento com o estrogênio aboliu o efeito da ovariectomia em todos os resultados, além de diminuir a expressão do RNAm da ECA nos rins, tanto na região cortical, quanto na medular, no pulmão e na aorta (Gallagher et al., 1999).

Além disso, trabalhos realizados em nosso laboratório (UFES-ES) mostraram que a ovariectomia bilateral aumentou a atividade da ECA plasmática e não alterou a atividade da ECA no tecido das artérias coronarianas de ratas (Gonçalves et al., 2004). No trabalho de Ahmed e cols. (2004), o uso de contraceptivos por mulheres jovens após uma infusão com angiotensina II não parece estar associada a uma diminuição dos receptores AT_1 , já que houve um aumento no seu RNAm, se comparado aos de mulheres que não faziam uso dos contraceptivos. O uso desses contraceptivos resulta em um aumento na circulação dos componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), incluindo a angiotensina II (Kang et al., 2001).

Essa interação do estrogênio com o sistema renina angiotensina é muito controversa, variando de acordo com a metodologia utilizada, o órgão analisado, as fases do ciclo hormonal, as diferentes espécies e a quantidade de sal na dieta. Além disso, não existe apenas o SRAA sistêmico, mas vários SRAA locais, tecidos-específicos, como o renal, o cardíaco, o cerebral, o testicular, etc (Dzau et al., 2001). Portanto, os componentes do SRAA são regulados cooperativamente e por mecanismos compensatórios (Dean et al., 2005).

Outro dado relevante no nosso estudo foi à modulação diferenciada da expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ pelo estrogênio e pela progesterona em rins de ratas férteis. A ovariectomia bilateral ocasionou uma redução de cerca de 44% e de 30% os valores da expressão da proteína da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na preparação de proteínas de membrana e total do córtex renal, respectivamente. Uma redução também foi encontrada na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na preparação de proteínas de membrana do córtex desses animais, após a ovariectomia. A reposição com estrogênio aumentou a sua expressão protéica em 30% e a valores similares aos do controle, na preparação de proteínas de membrana e total, respectivamente. A atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aumentou de forma similar ao controle, na fração microsomal do córtex renal desses animais.

Esses resultados poderiam demonstrar um dos mecanismos nos quais o estrogênio participaria da reabsorção de Na^+ ao longo do néfron, pela modulação de carreadores de sódio renais, evidenciado na normalização da fração de excreção de sódio no grupo ovariectomizado após a reposição estrogênica. Entretanto, nossos resultados não

encontraram alteração significativa na expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na medula renal desses animais sob as mesmas condições experimentais. Esse mecanismo de ação do estrogênico de reabsorção de sódio também foi comprovado por Tran et al. (1998), em que o estrogênio *in vitro* aumentou a expressão da proteína e da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em cultura de células de túbulos distais. Assim, a redução sérica nos níveis dos esteróides femininos e a terapia de reposição estrogênica teriam um efeito significativo na função dos transportadores de sódio no túbulo convoluto distal, podendo acarretar alterações clínicas importantes, particularmente nas mulheres pós-menopausadas, ou ainda, contribuindo para uma alteração no balanço dos fluidos corporais em mulheres na idade reprodutiva, ou na presença de hipertensão arterial e na gravidez (Verlander et al., 1998).

Na reposição com progesterona, não observamos alterações significantes na expressão da proteína e na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no córtex renal desses animais. Os dados são corroborados pelo trabalho de Rafestin-Oblin et al., 1991, em células de túbulo coletor cortical de ratos adrenalectomizados. Nesse trabalho, as células tubulares foram isoladas e pré-incubadas com aldosterona até atingirem sua atividade máxima da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. O tratamento com a progesterona e com a espiranolactona (antagonista do receptor de mineralocorticosteróide) apresentou o mesmo padrão de resposta, isto é, ambos inibiram o efeito estimulatório da aldosterona sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dose dependente. Já quando foram incubadas isoladas, sem a pré-incubação da aldosterona, não apresentaram alteração significativa na atividade dessa enzima nos rins desses animais, similares aos nossos resultados. Outro dado interessante foi

à ação diferenciada dos metabólitos progestogênicos, o 18-vinil-progesterona e o 18-etil-progesterona, que inibiu e estimulou, respectivamente, o efeito da aldosterona sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase dose dependente.

Outro dado relevante encontrado na literatura foi o trabalho de Morril et al., 2008, em que sugerem que a progesterona compete com a ouabaína com baixa afinidade, pelo seu sítio de ligação da subunidade alfa1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase. Ao utilizarem a ouabaína (inibidor da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase) e a progesterona marcada radioativamente, observaram que ambas competem e estimulam a meiose de ovócitos de anfíbios, como a *Rana pipiens* *in vitro*.

Embora trabalhos apresentem resultados mostrando que a progesterona compete pelos receptores de mineralocorticosteróide no túbulo renal distal (Rafestin-Oblin et al., 1991; Myles and Funder, 1996), causando um efeito natriurético transitório (Muller J, 1988; Myles and Funder, 1996), dependente da fase hormonal do animal, nosso resultado da fração de excreção de sódio no grupo tratado com progesterona foi similar ao do grupo controle. Isso poderia ser justificado por estudos que mostram um efeito compensatório da progesterona nos mecanismos de regulação do balanço de sódio corporal (Muller J, 1988; Braley et al., 1996; Thomas et al., 2006), como na ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, de forma similar a uma situação de restrição de sódio na dieta (Muller J, 1988; Adler et al., 1993; Braley et al., 1996).

Ratas ovariectomizadas tratadas com progesterona e com restrição de sódio na dieta não apresentaram diferença significativa no

aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona e da atividade da renina plasmática *in vivo*. Utilizando células isoladas da zona glomerulosa da adrenal desses animais, a progesterona aumentou a sensibilidade dessas células, estimulando uma via de conversão de corticosterona em aldosterona e a transcrição do RNAm da enzima aldosterona sintase *in vitro* (Braley et al., 1996), sugerindo uma maior ação na reabsorção de sódio nessas condições.

É provável ainda que a progesterona possa ter um efeito direto no sistema renina angiotensina aldosterona, independente da ação anti-mineralocorticosteroide, como demonstrado por Oelkers et al., 1974, em que o tratamento por 6 dias com progesterona aumentou a atividade da renina plasmática (ARP), os níveis plasmáticos da angiotensina II e a excreção de aldosterona, sugerindo que o aumento na excreção de aldosterona seja um efeito agudo (3 horas) e que o aumento na ARP seja um efeito crônico, apenas observado em três dias (Oparil et al., 1975). Uma terceira possibilidade, a progesterona poderia atuar como substrato para a biossíntese de aldosterona (Muller J, 1988). Uma quarta possibilidade foi demonstrada no trabalho de Rafestin-Oblin et al (2002) em que o metabólito 11-beta-hidroxi-progesterona pode atuar como um agonista do receptor de mineralocorticóide, estimulando absorção de sódio em células principais de ducto coletor cortical de mamíferos.

Alguns trabalhos vêm demonstrando efeitos indiretos da progesterona na concentração de sódio na composição do fluido extracelular, contudo devido à presença de seus receptores em segmentos do néfron (Rafestin-Oblin et al., 1991; Myles and Funder, 1996; Brunette and

Leclerc, 2002), sua ação também pode ser efetivada de forma direta, como na modulação da expressão de transportadores iônicos. Sua ação ocorre principalmente no túbulo distal, como demonstrado no trabalho de Brunette and Leclerc, 2002, em que a incubação de células isoladas de túbulo distal do néfron de coelhos, apresentou uma alteração máxima no transporte de sódio e cálcio em apenas 1 minuto. Resultado que não foi observado em células de túbulo proximal nas mesmas condições, sugerindo um mecanismo de ação direto e não-genômico. No trabalho de Thomas et al., 2006, o acetato de medroxi-progesterona aumentou a expressão do RNAm da α -ENaC *in vivo*, no córtex renal de camundongos machos, e *in vitro*, em células de túbulos distais dos rins de cães (MDCK, C7), resultando em um mecanismo de ação direto e genômico.

Todos esses mecanismos de retenção de sódio pela ação direta e indireta da progesterona poderiam explicar os valores da fração de excreção de sódio similar do grupo repostado com apenas progesterona aos do grupo controle.

Nossos resultados vêm demonstrando que tanto o estrogênio como a progesterona participam da modulação do CNGA-1 diretamente no córtex renal de ratas em idade reprodutiva. E na tentativa de isolar essa ação hormonal, *in vitro*, demonstramos que o estrogênio aumentou a expressão da proteína do CNGA-1, em uma incubação por 24h, doses dependentes (10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M e 10^{-7} M) em cultura celular, utilizando células de túbulo proximal de ratos (IRPTC). Esses dados de ação do estrogênio isolado e *in vitro* também foram corroboradas no trabalho de Brunette & Leclerc (2001), em uma incubação durante 15 minutos com $17\text{-}\beta$ -

estradiol (10^{-8} M) em células dos túbulos proximais e distais de rins de coelhos, apresentaram um forte aumento na reabsorção de sódio, tanto nos segmentos proximais, quanto nos distais, mostrando que o efeito direto do estrogênio se daria da mesma forma que nos co-transportadores NaCl (Verlander et al., 1998), e na bomba Na-K-ATPase (Tran et al., 1998), ocorrendo por mecanismos não-genômicos.

O estrogênio e a progesterona são hormônios esteróides, cujo mecanismo de ação clássico se dá pela ligação a receptores intracelulares. O hormônio atravessa a membrana plasmática das células-alvo e se liga aos receptores intracelulares específicos, formando o complexo hormônio receptor (Nadal et al., 2001; Norman et al., 2004). Esse complexo, então, desloca-se para o núcleo, onde atua como cofator de transcrição, ligando-se a regiões específicas do DNA (Silberger & Magleby, 1999), regulando a expressão de genes-alvo (Tsai & O'Malley, 1994). A ligação do complexo hormônio receptor ao DNA estimula ou inibe (Norman et al., 2004) as transcrições gênicas, que é seguida pelo processo de tradução e, caso não tenha sido inibida, aumenta os níveis de RNAm, o que leva à formação de proteínas específicas (O'Malley & Means, 1974). As proteínas estão relacionadas às respostas celulares (Santos et al., 2004). Além desse mecanismo genômico clássico, o estrogênio e a progesterona podem atuar em receptores presentes na membrana plasmática que ativam respostas celulares mais rápidas por segundos mensageiros específicos, isto é, mecanismo de ação não-genômica.

Além dos dados de função renal, nossos resultados pela técnica de *Western blotting* demonstraram a presença do canal de sódio CNGA-1 no

córtex e na medula renal. Contudo, essa localização não foi totalmente confirmada pela técnica de imunohistoquímica (imunofluorescência) que detectou esse canal predominantemente no córtex renal, situado na membrana basolateral nos túbulos proximais e distais do néfron, principais alvos de ação do estrogênio e da progesterona na modulação dos transportadores iônicos renais.

Os rins possuem a maior influência na regulação dos fluídos e dos eletrólitos corporais, apresentando uma elevada atividade metabólica tecidual. Para tanto, há a necessidade de um aporte gasoso (oxigênio e gás carbônico) e energético em constante dinamismo, que é mantido em detrimento de seu fluxo sanguíneo renal (FSR). Nos indivíduos normais e em repouso, o FSR pode chegar a consumir 25% do débito cardíaco e a sua manutenção ocorre pela autoregulação.

A autoregulação do fluxo sanguíneo é um fenômeno que evidencia a função da parede vascular na manutenção de uma perfusão sanguínea constante e fisiológica, em detrimento da labilidade nos níveis de pressão arterial que ocorre momento-a-momento (Juste et al., 2007; Cupples, 2007). Essa função está presente em alguns tecidos do organismo, embora seja particularmente destacado em órgãos como o cérebro e os rins (Juste et al., 2007). A autoregulação do fluxo sanguíneo renal (FSR) é baseada tradicionalmente em dois mecanismos: a resposta miogênica ou mecanismo miogênico (RM) e o “feedback” tubuloglomerular ou balanço tubuloglomerular (FTG) .

O mecanismo miogênico envolve a propriedade intrínseca do músculo liso vascular de contrair em resposta a uma força de estiramento

(tensão) (Johnson PC, 1980). No caso do músculo liso vascular, ele se contrai ou se relaxa de acordo com um respectivo aumento ou uma diminuição da tensão na parede elástica vascular causada pela pressão de perfusão renal (PPR). O aumento na pressão intraluminal dos vasos de menor calibre induz um aumento no raio vascular, determinando um aumento no fluxo sanguíneo do renal. O resultante desse estiramento aumenta a resistência vascular, ocasionando uma vasoconstrição, praticamente imediata entre 5-10 segundos (Just, 2007), diminuindo a pressão de perfusão renal e normalizando o fluxo sanguíneo do renal (Cupples, 2007). O início dos eventos que ocasionam o mecanismo miogênico é a despolarização da membrana celular. O estiramento pode ativar canais iônicos mecanossensíveis (estiramento-sensíveis), receptores de integrinas e a enzima fosfolipase C (D'Angelo and Meininger, 1994). Depois de iniciada a despolarização, ocorre à ativação de canais de cálcio voltagem dependente, levando ao influxo de cálcio, que ativa a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, aumentando a liberação do segundo mensageiro inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), ativando a resposta miogênica (Davis MJ, et al., 2001). A mobilização do aumento de cálcio intracelular envolve a calmodulina e a miosina leve, que são ativadas por fosforilação pela via da citocromo P450, da proteína quinase C, da rho-quinase e da fosforilase de miosina (Murphy et al., 2002; Just, 2007).

O balanço tubuloglomerular é um mecanismo de regulação complexa e específica renal, que ocasiona uma vasoconstrição na arteríola aferente, em detrimento de um aumento na concentração luminal do cloreto de sódio no fluido intratubular que perfunde o início do túbulo distal

detectado pelas células da mácula densa do aparelho justaglomerular (AJG) (Schnermann J et al., 1997). O aparelho justaglomerular é um aparato anatômico formado pelo sistema tubular e pelo sistema vascular de cada néfron, em que a alça ascendente espessa cortical de Henle, ou a parte inicial do túbulo distal convoluto (túbulo distal reto) se dispõe em contato íntimo com seu correspondente glomérulo e, sua respectiva arteríola aferente e eferente, formando uma unidade vasotubular (Thurau and Schnermann, 1965; Just, 2007). Nessa região do mesângio extraglomerular, existem células especializadas, chamadas de células da mácula densa, com a capacidade de detectar alterações na composição de NaCl do lúmen tubular, estabelecendo uma modulação retroalimentativa intra-néfron com o controle da resistência pré-glomerular e, conseqüentemente, com ritmo de filtração glomerular (RFG) (Castrop H, 2007). Isso ocorre em virtude da reabsorção de sal no segmento ascendente da alça de Henle ser ativa e, frequentemente, limitada pela difusão passiva de água pelo seu segmento tubular descendente. De modo que a concentração de NaCl luminal percebida pelas células da mácula densa é dependente da freqüência de fluxo tubular, isto é, uma maior freqüência de fluídos, ocasiona uma maior concentração de sal detectada pelo segmento distal tubular do néfron (Bell and Lapointe, 1997). E, um aumento na pressão arterial sistêmica pode aumentar o fluxo tubular, elevando na filtração glomerular e, redução na reabsorção ao longo do túbulo proximal. Essa informação de aumento na concentração de NaCl percebido pelas células da mácula densa é enviada para as células granulares da arteríola aferente por mecanismos parácrinos, causando uma vasoconstrição, restabelecendo as freqüências de filtração

glomerular e, mantendo o fluxo sangüíneo renal em níveis fisiológicos (Just, 2007). A atividade do transportador sensível a furosemida e a bumetanida $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ presente na membrana luminal das células da mácula densa é o sensor primário para a percepção da concentração de NaCl no aparelho justaglomerular (Bell and Lapointe, 1997) e, sua inibição aboliu a resposta do “feedback” tubuloglomerular (Wright and Schnermann, 1974).

Trabalhos vêm destacando duas moléculas purinérgicas como mediadores do balanço tubuloglomerular, o adenosina-tri-fosfato (ATP) e a adenosina (White et al., 2001; Jackson et al., 2002). Todas as classes dos receptores de adenosina são expressas no tecido renal, o receptor A1A está presente na arteríola aferente e quando ativado, causa vasoconstrição durante a resposta do balanço tubuloglomerular (Jackson et al., 2002; Peti-Peterdi, 2006), mediada pela proteína G_i , dependente da fosfolipase C e, subsequente aumento ao cálcio intracelular, através da ativação de canais de cálcio voltagem dependentes (Hansen et al., 2003). E, a administração de antagonistas inespecíficos dos receptores de adenosina, ocasiona uma redução significativa na resposta do “feedback” tubuloglomerular (Schnermann et al., 1977), sugerindo que a ativação do receptor de adenosina A1A é indispensável para a resposta fisiológica do balanço tubuloglomerular (Castrop et al., 2007).

Os receptores do ATP também estão expressos na vasculatura renal, como o P2X e P2Y (White et al., 2001) e, a isoforma P2X1 está presente na arteríola aferente e na artéria interlobular, cuja ativação ocasiona um efeito vasoconstritor (Chan et al., 1998; Inscho et al., 2004). A vasoconstrição da arteríola aferente é atenuada em resposta a um aumento

na pressão de perfusão renal, após o bloqueio farmacológico do receptor P2X e também, em camundongos deficientes geneticamente para o receptor P2X1 (Inscho et al., 1996; 2004). O estresse de cisalhamento vascular ocasiona liberação celular de ATP (Wang et al., 1996), a exposição ao antagonista do receptor P2X, desensibiliza os receptores de ATP, de modo que uma seguida exposição ao ATP, ocasiona um prejuízo na resposta do balanço tubuloglomerular e, conseqüentemente, na autoregulação do fluxo sanguíneo renal mediada pelo endotélio (Inscho et al., 1996).

Além do efeito isolado do ATP e da adenosina na resposta do balanço tubuloglomerular, estudos vêm demonstrando que há uma cooperação metabólica entre eles (Peti-Peterdi, 2006; Castrop, 2007), isto é, o ATP liberado pela membrana basolateral das células justaglomerulares e, secundariamente, pelas células mesangiais, pode sofrer degradação pela ação da enzima hidrolase-difosfato-1-nucleosídeo-trifosfato e pela 5'-ecto-nucleotidase no espaço intersticial do aparelho justaglomerular, gerando adenosina e ativando os receptores A1A, causando vasoconstrição na arteríola aferente, normalizando a perfusão do tecido renal (Shnermann J and Levine DZ, 2003, Castrop, 2007).

Portanto, um aumento no fluxo tubular, devido a um aumento no ritmo de filtração glomerular, reduziria a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal e, poderia aumentar a sua excreção renal. Em nossos resultados, o ritmo de filtração glomerular permaneceu sem alterações significantes, dados que foram corroborados pelo trabalho de Kurella et al., 2004, em que não foi detectado associação entre a função hormonal feminina e o ritmo de filtração glomerular. Ou ainda, no trabalho de Nielsen et al, 2003 em que a

reposição de estrogênio, isolada ou combinada com a progesterona não influenciou os níveis basais do ritmo de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal efetivo (FPRE). Contudo, mostramos que a fração de excreção de sódio aumentou no grupo ovariectomizado e a reposição hormonal restabeleceu seus valores a resultados similares ao do grupo controle, de modo que parece haver uma descompensação no balanço tubuloglomerular, em virtude da reposição isolada de estrogênio e de progesterona. Novak et al., 2001 observaram que a ovariectomia bilateral aumentou e a reposição conjugada de estrogênio/progesterona restabeleceu os valores do ritmo de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal efetivo. Fato que explicaria um aumento na fração de excreção de sódio de nossos resultados.

Outros trabalhos vêm demonstrando uma influência dos hormônios sexuais femininos na modulação dos principais efetores do balanço tubuloglomerular, o ATP e a adenosina (Cario-Toumaniantz et al., 1998; Xu et al., 2001). O estrogênio diminui o influxo de cálcio e aumentou o cálcio citosólico, ativando os receptores P2X7 ativados pelo ATP em células epiteliais (Gorodeski, 2004). Ou, que a ausência dos esteróides femininos module a expressão de receptores de adenosina, de modo que a ovariectomia bilateral reduziu a expressão dos receptores de adenosina A1, A2a e A3 nos cérebros de ratas (Rose'Meyer et al., 2003).

Já em células de rins de macacos, o 17- β -estradiol inibiu a ativação do receptor P2X7 pelo ATP, diminuindo a possibilidade de abertura do canal quando ativado, e conseqüentemente, da passagem de corrente pelo mesmo. O tratamento dessas células com a progesterona e com o 17-

α -estradiol nas mesmas condições não afetou significativamente a passagem da corrente por esse canal. E, como essas células não possuem receptores nucleares para o estrogênio (White et al., 1987), esses dados indicam um mecanismo esterio-específico e não-genômico ativados pelo estrogênio (Cario-Toumaniantz et al., 1996), evidenciando a relação dos esteróides femininos com balanço tubuloglomerular.

Enfim, diante desses resultados podemos concluir que:

- O canal de sódio CNGA-1 está presente na membrana basolateral nos rins de ratas, preferencialmente na região do túbulo proximal e distal do néfron cortical;

- O canal de sódio CNGA-1 e a enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ são modulados de forma diferenciada pelo estrogênio e pela progesterona no córtex renal de ratas. Isto é, o estrogênio modula de forma positiva a expressão da proteína do CNGA-1 e, a expressão da proteína e a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ renais, atuando diretamente em células do túbulo proximal. De modo que o CNGA-1 poderia ser um canal de influxo de sódio, mantendo as concentrações de sódio intracelulares adequadas para o funcionamento da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, na reabsorção de sódio, sob influência do estrogênio.

- Essa modulação seria mais um mecanismo pelo quais os esteróides femininos participam do controle do fluido extracelular e do balanço de sódio, principalmente, nos túbulos proximais e distais ao longo do néfron.

REFERÊNCIAS

Adler GK, Chen R, Menachery AI, Braley LM, Williams GH (1993). Sodium restriction increases aldosterone biosynthesis by increasing late pathway, but not early pathway, messenger ribonucleic acid levels and enzyme activity in normotensive rats. *Endocrinology*. Nov;133(5):2235-40.

Ahmad I, Redmond LJ, and Barnstable CJ. Developmental and tissue-specific expression of the rod photoreceptor cGMP-gated ion channel gene (1990). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 463–470.

Ahmed SB, Kang AK, Burns KD, Kennedy CJ, VESTA LAI, Cattran DC, Scholey JW, and Miller JA (2004). Effects of Oral Contraceptive Use on the Renal and Systemic Vascular Response to Angiotensin II Infusion. *J Am Soc Nephrol* 15: 780–786.

Aires, MM. (1999) Transporte tubular de solutos e água. Em *Fisiologia*, Editado por Margarida de Mello Aires Guanabara Koogan, 2 edição.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*. Jan;84(1):169-208. Review.

Aperita A, Larsson L & Zetterstrom (1981). Hormonal induction of Na-K-ATPase in developing proximal tubular cells. *Am J Physiol*, 10: F356-F360.

Aronson OS & Giebisch G. (1997) Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol.* 273(2 Pt 2):F179-92.

Aronson PS (1996) Role of ion exchangers in mediating NaCl transport in the proximal tubule. *Kidney Int*, 49:1665-1670.

Bell PD, Lapointe JY (1997). Characteristics of membrane transport processes of macula densa cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Jul;24(7):541-7.

Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, and Hofmann F (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7553–7557.

Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F. (1996). Molecular cloning and expression of the modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J Biol Chem.* 271:6349–6355

Biner HL, Arpin-Bott MP, Loffing J, Wang X, Knepper M, Hebert SC & Kaissling B. (2002). Human cortical distal nephron: Distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol*, 13: 836-847.

Bradford LW (1976). Problems of ethics and behavior in the forensic sciences. *J Forensic Sci* Oct;21(4):763-768.

Bradley J, Reiser J, Frings S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;15(3):3439. Review.

Braley LM, Menachery AI, Yao T, Mortensen RM, Williams GH (1996). Effect of progesterone on aldosterone secretion in rats. *Endocrinology.* 137(11):4773-8.

Breyer MD & Ando Y (1994) Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol*, 56:711-739.

Brown MJ & Haydock S (2000) Pathoetiology, epidemiology and diagnosis of hypertension. *Drugs*, 59:39-40.

Brunette MG & Leclerc M (2001). Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *Mol Cell Endocrinol*, 194: 183-190.

Brunette MG & Leclerc M (2002). Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. *Mol Cell Endocrinol*, 194: 183-190.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD & Rossier BC (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367: 463-467.

Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ferrier L, Pacaud P. Non-genomic inhibition of human P2X7 purinoceptor by 17 β -oestradiol (1998). *J Physiol*. May 1;508 (Pt 3):659-66.

Carley ME, Rickard DJ, Gebhart JB, Webb MJ, Podratz KC & Spelsberg TC (2003). Distribution of estrogen receptors α and β mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement. *Journal Int Urogynecol*, 14: 141-145.

Castrop H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine (2007). *Acta Physiol (Oxf)*. Jan;189(1):3-14. Review.

Chan, C.M., Unwin, R.J., Bardini, M. et al. (1998). Localization of P2X1 purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. *Am J Physiol* 274, F799–F804.

Chang EB (1996) Intestinal water and electrolyte absorption and secretion. *Transplant Proc*, 28:2679-2682.

Cowley AW Jr & Roman RJ (1996) The role of the kidney in hypertension. *JAMA* 275(20):1581-1589.

Cupples WA. Interactions contributing to kidney blood flow autoregulation (2007). *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jan;16(1):39-45. Review.

D'Angelo G, Meininger GA. Transduction mechanisms involved in the regulation of myogenic activity (1994). *Hypertension* 23: 1096–1105, 1994

Dantzler WH (2003) Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 136:453-478.

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response (2001). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1427–H1433.

Dean AS, Tan J, O'Brien ER & Leenen FH (2005). 17 β -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R759-R766.

Ding C, Potter ED, Qiu W, Coon SL, Levine MA, and Guggino SE (1997). Cloning and widespread distribution of the rat rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C1335–C1344.

Dubey RK & Jackson EK (2001). Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Renal Physiol*, 280: F365-F388.

Dusing R, Melder B & Kramer HJ (1976). Prostaglandins and renal function in acute extracellular volume expansion. *Prostaglandins*.12: 3-10.

Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D& Weber M (2001). The relevance of tissue angiotensin- converting enzyme: Manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am Jo Cardiol*, 88: 1L-20L.

Eckert T, Forsling¹ M L and Schwarzberg H. The effect of combined oestrogen and progesterone replacement on the renal responses to oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats (1999). *European Journal of Endocrinology* 141 297–302.

Fedosova NU, Esmann M. Nucleotide binding to Na,K-ATPase: pK values of the groups affecting the high affinity site (2007). *Biochemistry*. Aug 7;46(31):9116-22.

Feng L, Subbaraya I, Yamamoto N, Baehr W, and Kraus-Friedmann N. Expression of photoreceptor cyclic nucleotide-gated cation channel α subunit (CNGC α) in the liver and skeletal muscle (1996). *FEBS Lett* 395: 77–81.

Feraille E, Doucet A (2001). Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: Hormonal control. *Physiol Rev* 81: 345–418.

Feraille E, Mordasini D, Gonin S, Deschenes G, Vinciguerra M, Doucet A, Vandewalle A, Summa V, Verrey F, Martin PY (2003). Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann N Y Acad Sci* 986: 570–578.

Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC & Brosnihan KB (1999). Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 33(II): 323-328.

Gambling L, Dunford S, Wilson CA, McArdle HJ & Baines DL (2004). Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gammaENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int*;65(5):1774-81

Garthy H & Palmer LG (1997). Epithelial sodium channels function, structure and regulation. *Physiol Rev*. 77: 359 – 396.

Gonçalves WLS & Moyses MR (2004). Participação dos hormônios sexuais e da atividade de ECA na manutenção do tônus vascular coronariano de ratos normoensos e hipertensos. Dissertação de mestrado, CBM, Ufes.

Gonin S, Deschenes G, Roger F, Bens M, Martin PY, Carpentier JL, Vandewalle A, Doucet A, Feraille E (2001). Cyclic AMP increases cell surface expression of functional Na,K-ATPase units in mammalian cortical collecting duct principal cells. *Mol Biol Cell* 12: 255–264.

Gorodeski GI. Estrogen attenuates P2X7-R-mediated apoptosis of uterine cervical cells by blocking calcium influx (2004). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. Oct;23(8-9):1287-93

Greger R (1985) Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev*, 65:760-797.

Grubmeyer C. and Penefsky H.S (1981). *J. Biol. Chem.* 256 pp. 3718–3727.

Gustafsson JA (2003). What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24:479 –485

Guyton AC (1989) Roles of the kidneys and fluid volumes in arterial pressure regulation and hypertension. *Chin J Physiol*.32: 49-57.

Haas M (1989). Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol*, 51:443-457.

Hall JM, Couse JF & Korach KS (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *JBiol Chem* 276:36869–36872

Hansen, P.B., Castrop, H., Briggs, J. & Schnermann, J. (2003). Adenosine induces vasoconstriction through Gi-dependent activation of phospholipase C in isolated perfused afferent arterioles of mice. *J Am Soc Nephrol* 14, 2457–2465.

Harvey BJ, Doolan CM, Condliffe SB, Renard C, Alzamora R & Urbach V (2002). Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon. *Steroids*, 67: 483-491.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N & Mulvany MJ (1993). Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, 21:391-397. Review.

Hebert SC (1999). Molecular mechanisms. *Semin Nephrol*, 19:504-523.

Hoshi-Fukushima R, Nakamoto H, Imai H, Kanno Y, Ishida Y, Yamanouchi Y, Suzuki H (2008). Estrogen and angiotensin II interactions determine cardio-renal damage in Dahl salt-sensitive rats with heart failure. *Am J Nephrol*. 28(3):413-23.

Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, Evans RJ. Renal autoregulation in P2X1 knockout mice (2004). *Acta Physiol Scand* 181: 445–453.

Inscho, E.W., Cook, A.K. & Navar, L.G. (1996). Pressuremediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoceptor activation. *Am J Physiol* 271, F1077–F1085.

Jackson, E.K., Zhu, C. & Tofovic, S.P. (2002). Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F41-F51

Jacobson HR (1981). Functional segmentation of the mammalian nephron. *Am J Physiol*, 241:F203–F218.

Jacobson HR & Rector Jr. FC (1990). Renal regulation of extracellular fluid composition. *Kidney Int.* 38: 569 –743.

Johannesson M, Ludviksdottir D, Janson C (2000). Lung function changes in relation to menstrual cycle in females with cystic fibrosis. *Respir Med* 94:1043–1046.

Johnson PC (1980). The Myogenic Response. In: *Handbook of Physiology, Vascular Smooth Muscle: The Cardiovascular System*, Bethesda, MD: American Physiological Society, sect. 2, vol. II, p. 409–442.

Just A (2007). Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jan;292(1):R1-17.

Krause EG, Curtis KS, Davis LM, Stowe JR, Contreras RJ (2003). Estrogen influences stimulated water intake by ovariectomized female rats. *Physiol Behav.* Jul;79(2):267-74.

Lee HJ, Sagawa K, Shi W, Murer H & Morris ME (2000). Hormonal regulation of sodium/sulfate co-transport in renal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 225:49–57

Liu CG, Xu KQ, Xu X, Huang JJ, Xiao JC, Zhang JP, Song HP (2007). 17Beta-oestradiol regulates the expression of Na⁺/K⁺-ATPase beta1-subunit, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and carbonic anhydrase iv in H9C2 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Oct;34(10):998-1004.

Lubarski I, Karlsh SJ, Garty H (2007). Structural and functional interactions between FXND5 and the Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol.* Dec;293(6):F1818-26.

Macknight ADC & Leaf A (1977). Regulation of cellular volume, *Physiol. Rev.* 57: 510–573.

Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β and γ subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*, 104: R19-R23.

Mobasheri A, Avila J, C  zar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF, Mart  n-Vasallo P (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep.* Apr;20(2):51-91. Review.

Molday RS, Molday LL, Dose   A, Clark-Lewis I, Illing M, Cook NJ, Eismann E, and Kaupp UB (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell. Characterization and orientation of the amino terminus. *J Biol Chem* 266: 21917–21922.

Molday RS, Reid DM, Connell G, and Molday LL. Molecular properties of the cGMP-gated cation channel of rod photoreceptor cells as probed with monoclonal antibodies (1992). In: *Signal Transduction in Photoreceptor Cells*, edited by Hargrave PA, Hofmann KP, and Kaupp UB. Berlin: Springer-Verlag.

Monteiro SC, Mattos CB, Scherer EB, Wyse AT (2007). Supplementation with vitamins E plus C or soy isoflavones in ovariectomized rats: effect on the activities of Na(+), K (+)-ATPase and cholinesterases. *Metab Brain Dis* Jun;22(2):156-71. Epub 2007 May 19.

Morales MM, Carroll TP, Morita T, Schwiebert EM, Devuyst O, Wilson PD, Lopes AG, Cutting GR, Stanton BA, Dietz HC, Cutting GR & Guggino WB (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol* 270: F1038-F1048.

Morrill GA, Kostellow AB, Askari A.(2008). Progesterone binding to the alpha1-subunit of the Na/K-ATPase on the cell surface: insights from computational modeling. *Steroids*. 2008 Jan;73(1):27-40.

Mosselman S, Polman J & Dijkema R (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392:49–53

Moysés MR, Barker LA, Cabral AM. Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart (2001). *Braz J Med Biol Res*. 2001 Jul;34(7):949-58

Mularoni A, Beck L, Sadir R, Adessi GL, Nicollier M (1995). Down-regulation by progesterone of CFTR expression in endometrial epithelial cells: a study by competitive RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 26;217(3):1105-11

Muller J (1988). Regulation of aldosterone biosynthesis. Springer-Verlag. Berlin, pp 230-233.

Murphy TV, Spurrell BE, Hill MA (2002). Cellular signalling in arteriolar myogenic constriction: involvement of tyrosine phosphorylation pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 612–619,

Myles K & Funder JW (1996). Progesterone binding to mineralocorticoid receptors: in vitro and in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 270: E601-E607.

Nadal A, Diaz M & Valverde (2001). The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News in Physiological Sciences*, 16: 251-255.

Nascimento DS, Reis CU, Goldenberg RC, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC, Guggino SE, Guggino WB, Morales MM (2003). Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflügers Arch*, 446(5):593-9.

Nielsen CB, Flyvbjerg A, Bruun JM, Forman A, Wogensen L, Thomsen K. (2003). Decreases in renal functional reserve and proximal tubular fluid output in conscious oophorectomized rats: normalization with sex hormone substitution. *J Am Soc Nephrol*. Dec;14(12):3102-10.

Norman AW, Mizwichi, MT & Norman PG (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Rev*, 3: 27-40.

Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Sherwood OD, Ramirez RJ, Moalli PA, Conrad KP (2001). Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *J Clin Invest*. Jun;107(11):1469-75.

Novaira HJ, Botelho BF, Goldenberg RC, Guggino SE, Morales MM. (2004). Modulation of renal CNG-A3 sodium channel in rats subjected to low- and high-sodium diets. *Biochim Biophys Acta*. Oct 11;1665(1-2):101-10

Oelkers W, Schöneshöfer M, Blümel A. (1974). Effects of progesterone and four synthetic progestagens on sodium balance and the renin-aldosterone system in man. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov;39(5):882-90.

Ojeda NB, Grigore D, Robertson EB, Alexander BT (2007). Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension.* Oct;50(4):679-85.

Oelkers WKH (1996). Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids*, 61: 166-171.

O'Malley & Means AR (1974). Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, 183:610-619.

Oparil S, Ehrlich EN, Lindheimer MD. (1975). Effect of progesterone on renal sodium handling in man: relation to aldosterone excretion and plasma renin activity. *Clin Sci Mol Med.* 49(2):139-47.

Ornellas DS, Nascimento DS, Christoph DH, Guggino WB, Morales MM. (2002). Aldosterone and high-NaCl diet modulate CIC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch.* May;444(1-2):193-201.

Osswald H., Spielman W.S. and. Knox F.G (1978). *Circ. Res.* 43 pp. 465–469.

Pendergrass KD, Pirro NT, Westwood BM, Ferrario CM, Brosnihan KB, Chappell MC. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2).Lewis but not normotensive Lewis rats (2008). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul;295(1):H10-20

Peti-Peterdi, J. (2006). Calcium wave of tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F473–F480.

Petty KJ, Kokko JP & Marver D (1981). Secondary effect of aldosterone on Na-KATPase activity in the rabbit cortical collecting tubule. *J Clin Invest*, 68(6):1514-21.

Proverbio F., Proverbio T. and Marin R (1986). *Biochim. Biophys. Acta* 858 pp. 202–205

Rafestin-Oblin ME, Couette B, Barlet-Bas C, Cheval L, Viger A, Doucet A. (1991). Renal action of progesterone and 18-substituted derivatives. *Am J Physiol*. Jun;260 (6 Pt 2):F828-32.

Rafestin-Oblin ME, Fagart J, Souque A, Seguin C, Bens M, Vandewalle A (2002). A 11beta-hydroxyprogesterone acts as a mineralocorticoid agonist in stimulating Na⁺ absorption in mammalian principal cortical collecting duct cells. *Mol Pharmacol*. Dec;62(6):1306-13

Repke KR, Megges R, Weiland J & Schon R (1995). Location and properties of the digitalis receptor site in Na⁺/K⁺-ATPase. *FEBS Lett.* 13;359 (2-3):107-109.

Richards MJ and Gordon SE. Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels (2000). *Biochemistry* 39: 14003–14011,

Rose'Meyer RB, Mellick AS, Garnham BG, Harrison GJ, Massa HM, Griffiths LR (2003). The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Brain Res Protoc.* Mar;11(1):9-18.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniats M (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY.

Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moysés MR (2004). Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res.* Apr;37(4):569-75.

Schmitt R et al. (1999). Developmental expression of sodium entry pathways in rat distal nephron. *Am J Physiol*, 276: F367-F381.

Schnermann, J. & Levine, D.Z. (2003). Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol* 65, 501–529.

Schnermann J, Traynor T, Yang T, Huang YT, Oliverio MI, Coffmann T, Briggs JP (1997). Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 273: F315–F320.

Sealey JE, Itskovitz-Eldor J, Rubattu S, James GD, August P, Thaler I, Levrone J, Laragh JH. (1994). Estradiol- and progesterone-related increases in the renin-angiotensin system: studies during ovarian stimulation and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:258–264

Seely EW, Brosnihan KB, Jeunemaitre X, Okamura K, Williams GH, Hollenberg NK, Herrington DM (2004). Effects of conjugated oestrogen and droloxifene on the renin-angiotensin system, blood pressure and renal blood flow in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Mar;60(3):315-21.

Sharma PK & Thakur MK (2004). Estrogen receptor α expression in mice kidney shows Sex differences during aging. *Biogerontology*, 5: 375-381.

Shepard M, Dhulipala P, Kabaria S, Abraham NG, Lianos EA (2002). Heme oxygenase-1 localization in the rat nephron. *Nephron*.;92(3):660-4

Shi Fangxiong and Wang Tian (2005). Stage- and Cell-Specific Expression of Soluble Guanylyl Cyclase Alpha and Beta Subunits, cGMP-Dependent Protein Kinase I Alpha and Beta, and Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit 1 in the Rat Testis. *J Androl*;26:258–263

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, et al. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*. Nov 4;79(3):407-14.

Silberger SD & Magleby KL (1999). Betting the odds with big K. *Science*, 285:1859-1860.

Stachenfeld NS, Keefe DL & Taylor HS (2005). Responses to a saline load in gonadotropin-releasing hormone antagonist-pretreated premenopausal women receiving progesterone or estradiol-progesterone therapy. *J Clin Endocrinol. Metab*, 90(1): 386-394.

Stachenfeld NS, Silva C, Keefe, DL, Kokoszka CA & Nadel ER (1999). Effects of oral contraceptives on body fluid regulation. *J Appl Physiol*, 87(3): 1016-1025.

Stachenfeld NS, Taylor HS. Effects of estrogen and progesterone administration on extracellular fluid (2004). *J Appl Physiol*. Mar;96(3):1011-8

Stachenfeld NS, Taylor HS, Leone CA & Keefe, DL (2003). O estrogen effects on urine concentrating response in young women. *J Physiol*, 552: 869-880.

Strokes JB & Sigmund RD (1998). Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and Steroids: Organ tissue and steroid heterogeneity. *Am J Physiol*, 274: C1699-C1707.

Sweezey NB, Gauthier C, Gagnon S, Ferretti E, Kopelman H (1996). Progesterone and estradiol inhibit CFTR-mediated ion transport by pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol*. Nov;271(5 Pt 1):G747-54.

Takata, K, Tajika, Y, Matsuzaki, T, Aoki, T, Suzuki, T, Abduxukur, A, Hagiwara, H., (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: water channel aquaporin-2 of kidney collecting duct cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96: 255-259.

Thomas CP, Liu KZ, Vats HS. (2006). Medroxyprogesterone acetate binds the glucocorticoid receptor to stimulate alpha-ENaC and sgk1 expression in renal collecting duct epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb;290(2):F306-12.

Thurau K, Schnermann J (1965). The sodium concentration in the macula densa cells as a regulating factor for glomerular filtration (micropuncture experiments). *Klin Wochenschr*. Apr 15;43:410-3.

Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA and Wise PM (2004). Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science* 304:1269–1273

Uchida S (2000). In vivo role of ClC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol*, 279:F802 –F808.

Vallon V., *News Physiol. Sci.* 18 (2003), pp. 169–174.

Vandorpe DH, Ciampolillo F, Green RB, Stanton BA. (1997). Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium absorption by IMCD (mIMCD-K2) cells. *Am J Physiol.* Mar;272(3 Pt 1):C901-10.

Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR & Hebert SC (1998). Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Am Soc Nephrol*, 5: 1112-1119.

Vinciguerra M, Arnaudeau S, Mordasini D, Rousselot M, Bens M, Vandewalle A, Martin PY, Hasler U, Feraille E. (2004). Extracellular hypotonicity increases Na,K-ATPase cell surface expression via enhanced Na⁺ influx in cultured renal collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol.* Oct;15(10):2537-47.
 Review. Zolotnitskaya A, Satlin LM Developmental expression of ROMK in rat kidney. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 2):F825-36.

Vinciguerra M, Deschênes G, Hasler U, Mordasini D, Rousselot M, Doucet A, Vandewalle A, Martin PY, Féraillé E (2003). Intracellular Na⁺ controls cell surface expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. *Mol Biol Cell.* 2003 Jul;14(7):2677-88.

Xu HL, Santizo RA, Koenig HM, Pelligrino DA (2001). Chronic estrogen depletion alters adenosine diphosphate-induced pial arteriolar dilation in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov;281(5):H2105-12.

Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S.D. & Fitz, J.G. (1996). Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12020–12025.

Wengert M, Adão-Novaes J, Assaife-Lopes N, Leão-Ferreira LR, Caruso-Neves C (2007). Adenine-induced inhibition of Na(+)-ATPase activity: Evidence for involvement of the Gi protein-coupled receptor in the cAMP signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*. Nov 15;467(2):261-7.

White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M (1987). Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol*. Oct;1(10):735-44.

White, S.M., Imig, J.D., Kim, T.T., Hauschild, B.C. & Inscho, E.W. (2001). Calcium signaling pathways utilized by P2X receptors in freshly isolated preglomerular MVSMC. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F1054–F1061.

Wohlfart P, Haase W, Molday RS, and Cook NJ (1992). Antibodies against synthetic peptides used to determine the topology and site of glycosylation of

the cGMP-gated channel from bovine rod photoreceptors. *J Biol Chem* 267: 644–648.

Work J & Jamison R (1987). Effect of adrenalectomy on transport in the rat medullary thick ascending limb. *J Clin Invest* 80:1160-1164.

Wright, F.S. & Schnermann, J (1974). Interference with feedback control of glomerular filtration rate by furosemide, triflocin, and cyanide. *J Clin Invest* 53, 1695–1708.

Zhang Q, Pearce-Kelling S, Acland GM, Aguirre GD, and Ray K (1997). Canine rod photoreceptor cGMP-gated channel protein α -subunit: studies on the expression of the gene and characterization of the cDNA. *Exp Eye Res* 65: 301–309.

Zolotnitskaya A, Satlin LM (1999). Developmental expression of ROMK in rat kidney. *Am J Physiol.* Jun;276(6 Pt 2):F825-36.

